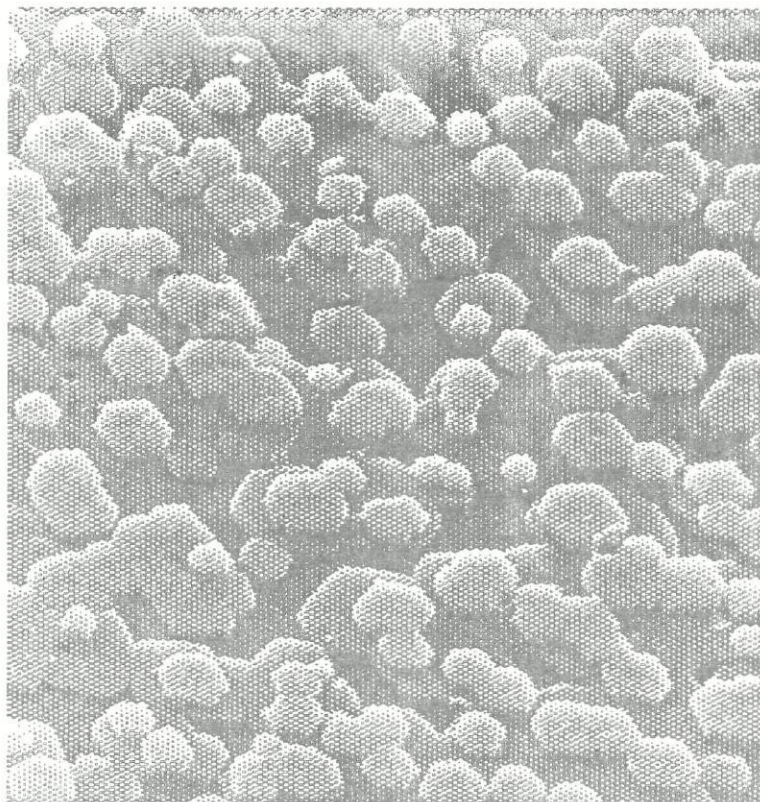


Jorge Pereira Machado

**ESTUDOS MORFOFUNCIONAIS  
DA GÉNESE DA CONCHA  
DE *ANODONTA CYGNEA***



· Porto ·  
1989

JORGE PEREIRA MACHADO

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar  
Universidade do Porto

ESTUDOS MORFOFUNCIONAIS DA GÉNESE DA CONCHA DE *ANODONTA CYGNEA*

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências  
Biomédicas, Especialidade de Fisiologia, apresentada ao  
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar  
sob a orientação do Prof. Dr. Hugo Gil Ferreira.

-PORTO-

1989



De acordo com o disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados, em grande parte, resultados contidos nos seguintes trabalhos de colaboração já publicados ou em vias de publicação:

- Machado J., Castilho F., Coimbra J., Sá C. and Monteiro E. 1988. Ultrastructural and cytochemical studies in the mantle of *Anodonta cygnea*. *Tissue and Cell*, 20 (5), 797-807.
- Coimbra J., Machado J., Ferreira K.G. and Ferreira H.G. 1988. Ion transport across the outer epithelium of the mantle of *Anodonta cygnea*. *Jour. of Exp. Biol.* 140, 65-88.
- Machado J., Coimbra J., Sá C. and Cardoso I. 1988. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comp. biochem. Physiol.* 91 (4), 645-651.
- Machado J., Coimbra J. and Sá C. 1988. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by TBTO treatments. *Comp. Biochem. and Physiol.* 92C (1), 77-80.
- Machado J., Ferreira K.G., Ferreira H.G. and Coimbra J. 1988. Substrate activation of the short-circuit current of outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 91 (3), 487-492.
- Machado J., Coimbra J., Castilho F. and Sá C. 1989. The effects of diflubenzuron on the shell formation of the freshwater clam, *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* (em publicação).
- Machado J., Ferreira, Ferreira H.G. and Fernandes P.L. The acid-base balance of the outer mantle of *Anodonta cygnea*. *Jour. of Exp. Biol.* (em publicação).

Para cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, esclarecemos serem da nossa inteira responsabilidade a execução das experiências que estiveram na base dos resultados utilizados, bem como o desenvolvimento das técnicas de isolamento, montagem e manutenção *in vitro* do epitélio extrapaleal do manto de *A. cygnea* e ainda a adaptação de técnicas de microeléctrodos e de medição das secreções de ácido e base ao estudo desta preparação. As técnicas de raio-X, microscopia electrónica de transmissão e de varrimento e espectrofotometria de absorção atómica foram executadas por colaboradores especializados a quem se agradece em local próprio.



## AGRADECIMENTOS

O trabalho apresentado nesta dissertação resultou, em grande parte do espírito de colaboração desenvolvido nestes últimos anos entre os Laboratórios de Fisiologia do Instituto Gulbenkian de Ciência e o Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e que muito influenciou a minha opção por uma carreira científica.

Quero agradecer de um modo muito particular ao Prof. Dr. Hugo Gil Ferreira a sua orientação, seus ensinamentos e espírito científico rigorosamente crítico, bem como sua permanente disponibilidade e oportunidades criadas na realização dos trabalhos experimentais. Devo-lhe ainda toda a admiração e estima pela correção e clareza com que sempre respondeu às dificuldades e solicitações profissionais.

À Doutora Karin Gil Ferreira devo a sua orientação e colaboração experimental, seu criticismo e solicitude no decurso dos estudos electrofisiológicos nomeadamente de cinética isotópica em condições de curto-circuito, medição de potencial eléctrico e das concentrações iónicas intracelulares.

Ao Prof. Dr. João Coimbra agradeço a sua apreciação e discussão científica em alguns trabalhos, as facilidades concedidas e o encorajamento na realização de tarefas durante o período de preparação desta dissertação.

Ao Eng. Pedro Fernandes devo o seu valioso contributo e orientação no campo da electrónica e informática. Fico igualmente reconhecido a Urbino Santos pelo seu impriscindível apoio técnico no desenho e construção de componentes usados na instrumentação. A Joaquim Honorato manifesto a minha amizade pela sua incansável presença nos trabalhos experimentais. À Lurdes Santos devo todo o aprêço pelo seu eficiente apoio secretarial.

Quero expressar o meu reconhecimento ao Eng. Carlos Sá e Emanuel Monteiro pelo tempo dispensado no estudo ultraestrutural em microscopia electrónica de transmissão e de varrimento respectivamente, à Eng. Maria Lurdes Reis pelas análises de raio-X e à Dr. Isabel Cardoso e Dr. Andrade Ferreira pelas análises de espectrofotometria de absorção atómica. Ao Centro de Microscopia electrónica do Porto e ao Laboratório de Biologia Celular devo a amabilidade que tiveram na cedência dos meios necessários ao estudo citológico da preparação epitelial.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) estou



grato pela preciosa ajuda financeira que tornou possível a aquisição de equipamento laboratorial, material de consumo e deslocções ao Instituto Gulbenkian de Ciência onde decorreram grande parte dos trabalhos. Aos laboratórios BIAL e JANSSEN fico também agradecido pelas pesquisas bibliográficas amavelmente realizadas.

Agradeço ainda a Sara Gomes e José Andrade e Teresa Barandela pela ajuda nas colheitas de material biológico e apoio laboratorial, a Anselmo Carraça pela legendagem das figuras, ao Dr. Abel Roldão pela composição fotográfica, a Gualter Ramiro pelo cuidado e diligência postos na impressão deste trabalho e a todos aqueles que, de uma maneira geral, contribuíram para o bom êxito do mesmo.

*A meus Pais*



*À minha Mulher  
e Filhos*

## ÍNDICE

Capítulo I: Introdução.....	1-37
Capítulo II: Estudo Ultraestrutural e Citoquímico do Manto...	1-12
Capítulo III: Electrofisiologia do Epitélio Extrapaleal.....	1-34
Capítulo IV: Balanço Ácido-Básico.....	1-11
Capítulo V: Activação da corrente de Curto-Circuito.....	1-10
Capítulo VI: Indução da Calcificação da Concha por Acidose....	1-9
Capítulo VII: Biomineralização da Matriz Orgânica.....	1-11
Capítulo VIII: Espessamento da Concha pelo TBTO (Poluente)....	1-5
Capítulo IX: Desorganização da Matriz Orgânica pelo Diflubenzuron (Poluente).....	1-8
Capítulo X: Conclusões Gerais.....	1-6
Bibliografia.....	1-18



## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1-DESCRIÇÃO ANATOMO-FUNCIONAL

#### 1.1-Morfologia

*Anodonta cygnea* é um molusco de água doce pertencente à classe Bivalvia, subclasse Lamellibranchia e família Unionidae. Caracteriza-se fundamentalmente por possuir simetria bilateral, manto com dois lóbulos aderentes a duas valvas calcárias (concha), quatro palpos labiais, lamelas brânquiais extensas ciliadas e por não apresentar cabeça e rádula (Franc, 1960; Storer *et al.*, 1979; Seed, 1983).

Como se pode ver nas Figuras I.1a, I.1b, I.2a e I.2b o corpo mole, achatado e mais ou menos alongado, sobressaindo em direcção à face ventral, encontra-se inteiramente envolvido por duas pregas laterais e simétricas provenientes do tegumento dorsal. Estas pregas, de dimensões apreciáveis, constituem os lóbulos do manto que delimitam pela face interna uma cavidade situada ventralmente em relação ao tronco principal do corpo e que se designa por cavidade intrapaleal. Esta cavidade pode ficar totalmente isolada graças ao ajuste perfeito das margens musculares livres do manto. Na região posterior, as margens do manto formam dois pequenos canais: um ventral ou sifão de entrada e um dorsal ou sifão de saída. As faces externas dos dois lóbulos do manto revestem inteiramente as duas valvas da concha. O bordo do manto contorna paralelamente o bordo da concha segundo uma linha (linha paleal) onde se inserem as fibras musculares aí existentes. Este ajuste à periferia, entre o manto e a concha, origina uma segunda



cavidade, a cavidade extrapaleal, situada entre a concha e a face externa do manto, que encerra um líquido de composição muito idêntica à da hemolinfa do animal (Taylor *et al.*, 1969; Istín, 1970). A concha é constituída por duas valvas igualmente desenvolvidas e de forma ovalada sendo a região posterior mais estreita que a anterior e a região dorsal mais espessa que a ventral. Na região médio-dorsal as duas valvas da concha articulam-se à custa de um forte ligamento elástico que funciona como charneira (Franc, 1960; Storer *et al.*, 1979; Seed, 1983). A concha é constituída por três camadas sobrepostas: uma camada externa (periostraco) delgada, colorida e endurecida por escleroproteínas; uma camada média prismática de carbonato de cálcio cristalino; e uma camada interna, nacarada ou lamelar, formada de grande número de lâminas delgadas de carbonato de cálcio com uma ligeira iridescência semelhante à de madrepérola (Beedham, 1958; Taylor *et al.*, 1969; Storer *et al.*, 1979; Beaumont *et al.*, 1981; Wilbur e Saleuddin, 1983). Na linha média e dividindo a cavidade intrapaleal incompletamente, há uma massa de tecido muscular, o pé. No seu interior há uma pequena região intestinal e as gónadas, localizando-se os restantes órgãos internos num tronco dorsal (Storer *et al.*, 1979). Como se pode ver na Figura I.1b e na Figura I.2b de cada lado do pé há um par de brânquias, brânquias externas e internas, constituídas por lamelas brânquiais unidas ventralmente formando uma estrutura em W. Dois grandes músculos transversais, o adutor anterior e o adutor posterior, inserem-se na face interna de cada valva e servem para manter as valvas encostadas (Fig. I.1b e Fig. I.2a).

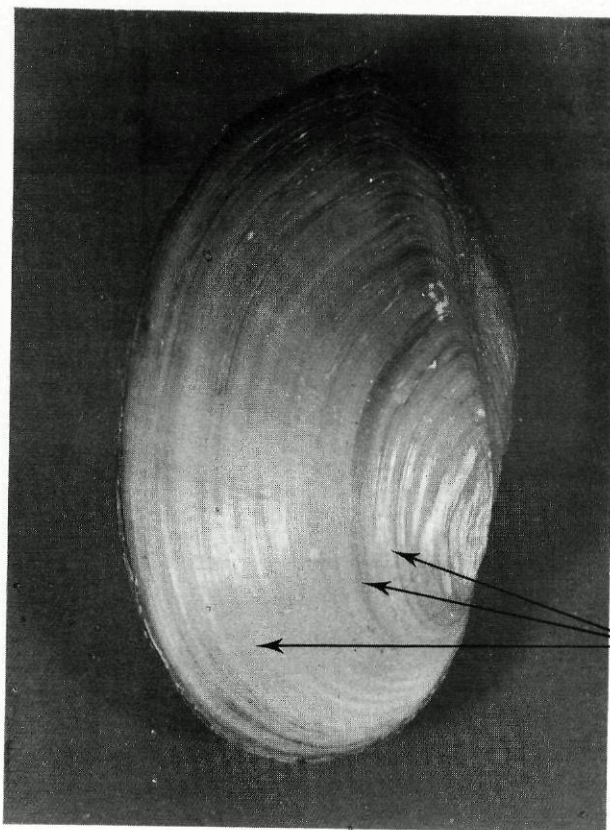
Como se pode observar na Figura I.3 *A. cygnea* possui um



Fig. I.1 - Fotografia de *A. cygnea* recolhida na Lagoa de Mira a Norte de Portugal. 1a) Face lateral esquerda da concha com as linhas de crescimento visíveis. 1b) Face ventral de um animal aberto.

REGIÃO POSTERIOR

FACE VENTRAL

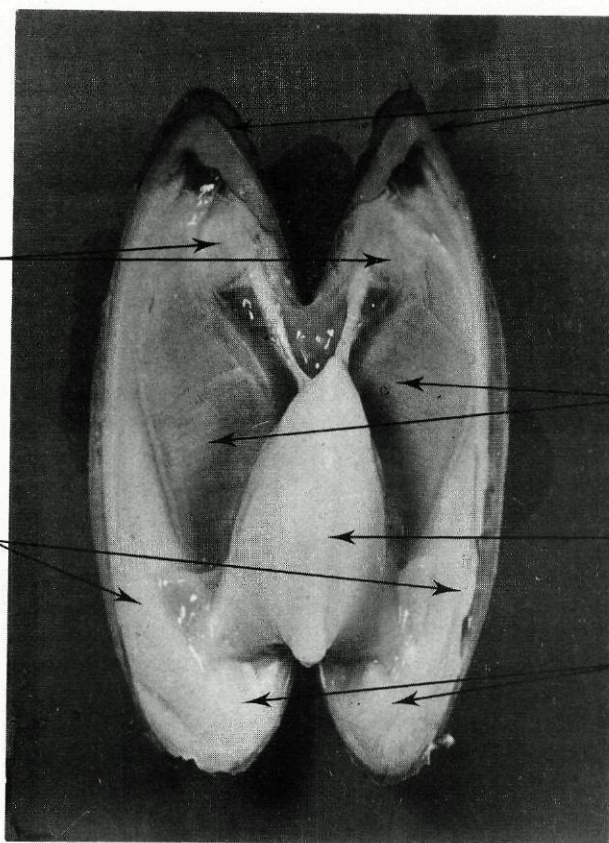


FACE DORSAL

Linhas de crescimento

Adutor posterior

Manto



Valvas

Brânquias

Pé

Adutores anteriores

REGIÃO ANTERIOR



sistema circulatório simples, sem capilares sanguíneos entre as artérias e veias (sistema aberto). O coração envolvido pelo pericárdio compreende duas aurículas e um ventrículo musculoso estando este em torno do recto. O ventrículo bombeia o sangue pela aorta anterior em direcção ao pé e às vísceras (excepto rins e brânquias) e pela aorta posterior em direcção ao recto e ao manto. Uma parte do sangue arterial percorre vasos propriamente ditos, e outra parte pode confluir no interior de seios sanguíneos existentes no pé ou ainda difundir para os espaços intercelulares. O sangue dirigido ao manto é aí oxigenado e retorna às aurículas directamente. O sangue que circula nos outros órgãos converge nos rins através duma veia comum passando de seguida às brânquias para aí ser também oxigenado antes de voltar às aurículas. Deste modo, a respiração ocorre no manto e nas brânquias (Storer *et al.*, 1979; Beaumont et Cassier, 1981; Seed, 1983).

O sangue, frequentemente designado por hemolinfa, corresponde a cerca de 55% do peso do corpo (sem a concha) (Chaisemartin *et al.*, 1970) e consiste num líquido de aspecto ligeiramente incolor, com alguns elementos figurados e cujo teor em substâncias orgânicas e inorgânicas é reduzido, daí a sua reduzida pressão coloido-osmótica. O meio interno do animal é mais concentrado que o meio ambiente possuindo a hemolinfa uma osmolalidade de cerca de 57 mOsmol enquanto que a água do local onde foram colhidos os animais que estudámos tinha cerca de 22.0 mOsmol, o que traduz uma razoável capacidade de osmoregulação. Nestes animais a composição iónica da hemolinfa é a seguinte: 5.58 mM de cálcio, 1.0 mM de magnésio, 20.8 mM de sódio, 0.71mM de potássio, 15.2 mM de cloro (ver Tabela III.1, Capítulo III).

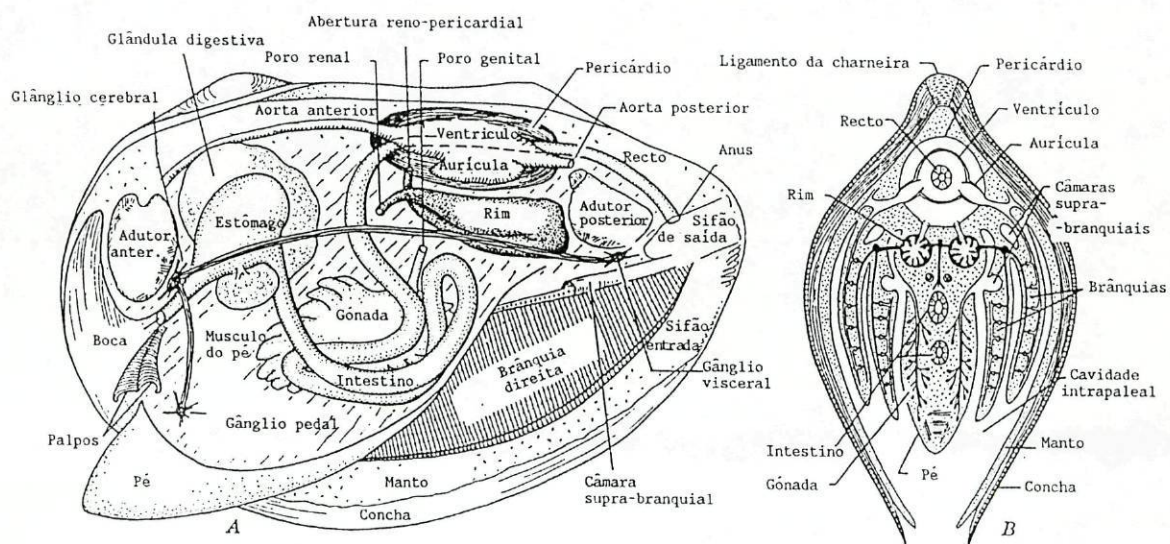


Fig. I.2 - Representação diagramática das estruturas internas de *A. cygnea*. 2a) Observação em corte longitudinal quando a concha, o manto e as brânquias do lado esquerdo são removidos. 2b) Observação em corte transversal ao nível da região do coração (segundo Storer *et al.*, 1979).



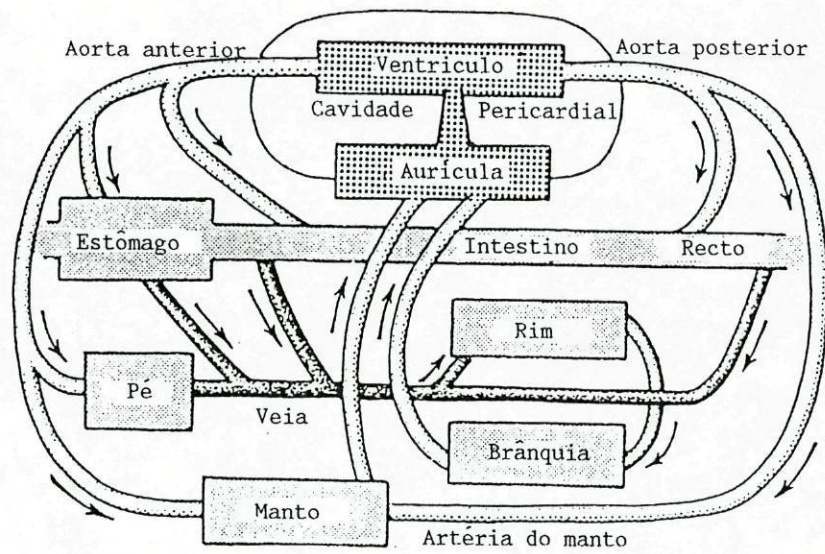


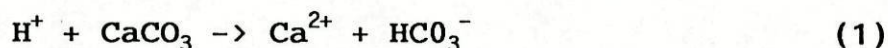
Fig. I.3 - Diagrama do sistema circulatório e do fluxo sanguíneo de um molusco de água (segundo Storer *et al.*, 1979).

Esta composição iônica é semelhante à descrita por Potts (1954a). O déficit aniônico (cerca de 14.6 mM) deve corresponder em grande parte à concentração de bicarbonatos. Os elementos figurados do sangue são amoebócitos e eritrócitos que provavelmente conterão algum pigmento respiratório do tipo da hemoglobina (Hill e Welsh, 1966).

O equilíbrio ácido-básico na hemolinfa destes animais é frequentemente afectado por circunstâncias naturais, como por exemplo pelas condições de anoxia, resultante de uma redução no caudal das águas. Origina-se então uma acumulação de ácidos orgânicos (ácido succínico e láctico) geradora de acidose a que facilmente sobrevive (Burton, 1983). O control do pH do meio interno em condições agudas deve-se essencialmente ao poder tampão dos bicarbonatos. A grande reserva de  $\text{CaCO}_3$  da concha dos moluscos constitui uma fonte ideal de bicarbonatos para tamponar o meio interno (Burton, 1983). Em *A. cygnea* em anaerobiose, o pH diminui pouco porque bicarbonatos provenientes da concha entram para a hemolinfa (Dotterweich and Elssner, 1935). Segundo Istín e Kirschner (1968) em condições de aerobiose há um fluxo líquido de cálcio para a concha favorecendo o seu crescimento normal, mas em anaerobiose acentuada a concha serviria como um reservatório de tampão usado pelo animal na neutralização de ácidos orgânicos produzidos metabolicamente. O fluxo líquido de bicarbonatos será em direcção à hemolinfa. Dado a existência de outras reservas internas de  $\text{CaCO}_3$  localizadas por Istín e Girard (1970b) no manto de *A. cygnea*, foi sugerido, em experiências com preparações do manto, que estas reservas associadas à anidrase carbónica constituíam igualmente um sistema tampão da hemolinfa, uma vez que



tensões crescentes de dióxido de carbono determinariam a libertação de cálcio e de bicarbonatos (Istin e Girard, 1970a e 1970b). Em situações de acidose (metabólica, respiratória ou ambas) há libertação de cálcio e de bicarbonatos segundo o esquema:



Dado que se desconhece em grande parte a origem dos bicarbonatos implicados na regulação do balanço de protões, na generalidade dos moluscos de água doce, abordaremos esta questão no presente trabalho. Primeiro, porque sendo o manto rico em cálcio e perfundido por um débito elevado de hemolinfa, a manutenção do pH ideal seria mais facilmente alcançada pela mobilização directa (no sentido da remoção ou deposição) destas reservas internas. Em segundo lugar porque, embora o nosso objectivo principal seja o de estudar o papel fisiológico do manto na formação da concha, parece relevante tratar igualmente os aspectos relativos ao equilíbrio ácido-básico, visto o cálcio e os bicarbonatos estarem implicados em ambos os processos. Deste modo, o estudo do equilíbrio ácido-básico poderá facilitar a compreensão dos mecanismos de calcificação.

A renovação da água no interior da cavidade intrapaleal é um factor importante no fornecimento de oxigénio e de partículas alimentares sendo vários os processos mecânicos que contribuem para tal, de que são exemplos os movimentos ciliares brânquiais. Como se pode observar na Figura I.4 e conforme as descrições de Storer *et al.* (1979) e Seed (1983) as brânquias são uma estrutura



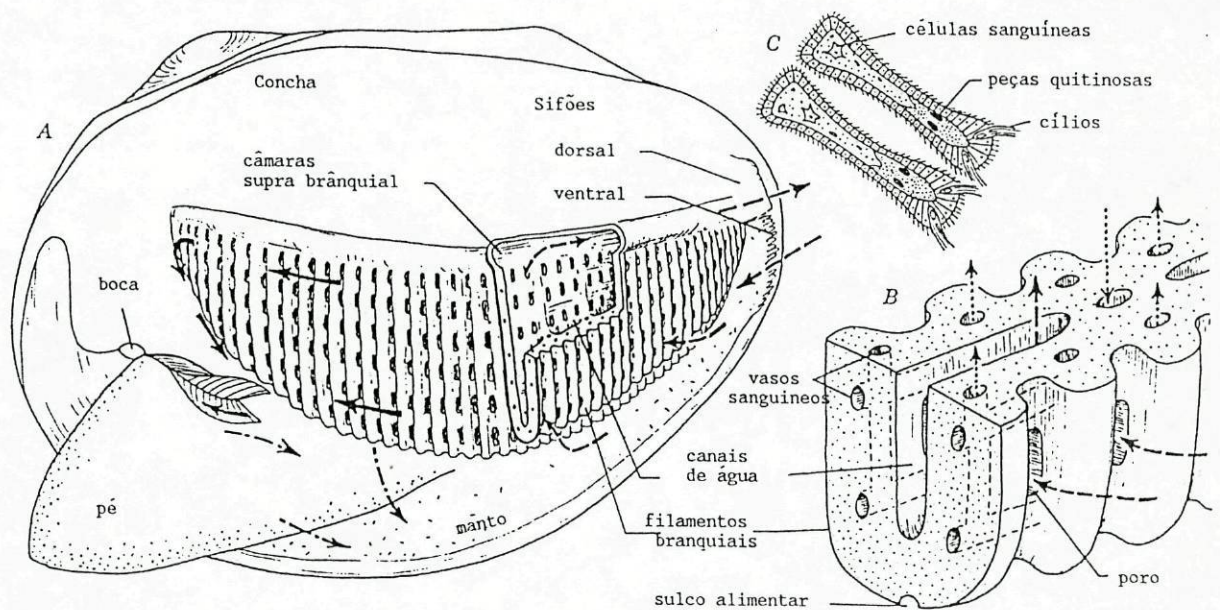


Fig. I.4 - Diagrama da estrutura brânquial de um molusco de água doce. 4a) Corte longitudinal, com remoção das estruturas do lado esquerdo, mostrando a organização interna da brânquia: via de circulação da água (<---); via de circulação de partículas alimentares retidas pelos mucus e levadas para a boca (<—); via de partículas rejeitadas (<---); 4b) Porção de brânquia aumentada: via de fluxo sanguíneo, em baixo os vasos aferentes e em cima os eferentes. 4c) Corte transversal de dois filamentos brânquiais muito ampliados para mostrar a superfície ciliada (segundo Storer et al., 1979).



complexa resultando da associação de canais de água e de vasos sanguíneos. Cada lamela brânquial é constituída por filamentos verticais reforçados por peças quitinosas e ligadas entre si por filamentos horizontais que deixam pequenos orifícios de permeio. Divisões transversais entre as duas lamelas contíguas dividem o interior duma brânquia em muitos canais aquosos verticais. Dorsalmente os canais aquosos de cada brânquia convergem numa câmara suprabrânquial comum que se estende posteriormente até ao sifão de saída. O sangue proveniente das veias renais passa através de vasos estreitos aferentes e eferentes nas junções lamelares e interlamelares onde se oxigena antes de retornar ao coração. Os filamentos brânquiais possuem uma série de tractos ciliares bem definidos que desempenham funções diferentes. Os cílios laterais poderosos, localizados de cada lado do filamento e dispostos em fila contínua, criam correntes de entrada e de saída através dos sifões de entrada e de saída respectivamente. Os cílios frontais nas cristas de cada filamento servem para reter, seleccionar e transportar material alimentar em suspensão, quer para a região dorsal quer para a ventral, até encontrar sulcos de recolha alimentar que o conduzem à boca. Esta acção é, segundo Storer *et al.* (1979) e Morton (1983), complementada pelos palpos labiais e muito provavelmente pelo muco segregado nas células brânquiais, não se sabendo contudo qual o mecanismo de actuação do muco.

## 1.2-Condições ecológicas

*A. cygnea*, molusco de água doce utilizado no presente estudo, foi recolhida na lagoa de Mira a norte de Portugal, onde vive em águas muito pouco movimentadas e com uma profundidade muito baixa. O período de vida desta espécie inicia-se no mês de Agosto com o desenvolvimento do embrião no interior dos canais de água, nas brânquias externas da fêmea, seguindo-se o aparecimento das primeiras larvas (gloquídio) por volta do mês de Outubro (Galhano e Silva, 1983). Segundo estes autores, a partir de Janeiro estes gloquídeos iniciam uma fase temporária de parasitismo alojando-se nas brânquias, lábios ou barbatanas dos peixes onde passam por metamorfoses. Esta vida parasitária cessará por volta do mês de Abril e iniciar-se-á a fase adulta no fundo da lagoa com crescimentos ciclicamente sazonais. Este crescimento fica bem expresso na face externa da concha pela presença de linhas de crescimento (Figs I.1a e I.5a) o que permite avaliar a idade do animal. Segundo Storer *et al.* (1979) e Seed (1983), *A. cygnea* desenvolve posteriormente um tipo de vida sedentária fixando-se numa posição ligeiramente inclinada para a face ventral com a região anterior do corpo introduzida na lama ou na areia e com os sifões de entrada e de saída em contacto com a água (Figs I.5a e I.5b). Pode contudo, de quando em quando, realizar pequenas e lentas deslocações na lama através da expansão do pé por entre as duas valvas seguida da contracção dos seus músculos. As variações de volume do pé efectuam-se à custa de um enchimento e esvaziamento dos seios sanguíneos localizados no pé. Estes movimentos da concha ao longo da lama desenham dois sulcos paralelos marcados pelas duas valvas. Este molusco alimenta-se de microorganismos



em suspensão como por exemplo microalgas, protozoários, partículas orgânicas e detritos de natureza variada que penetram no interior da cavidade intrapaleal arrastadas por pequenas correntes de água originadas pelas vibrações dos cílios brânquiais e do manto (Morton, 1983). É de realçar ainda a resistência deste animal a condições de vida desfavoráveis, como por exemplo a anoxia, altura em que mantém a concha hermeticamente fechada e suportando um tipo de vida latente que pode durar vários dias. A água da lagoa onde os animais foram colhidos (ver Tabela III.1, Capítulo III) tem cálcio (1.64 mM), magnésio (0.42 mM), sódio (1,39 mM), potássio (0.48 mM) e cloro (5.3 mM) a que corresponde uma osmolalidade baixa de cerca de 22.0 mOsmoles. A temperatura da água oscila ao longo do ano entre os 10°C no inverno e os 20°C no verão, tal como o seu volume, mais elevado no inverno (caudal de entrada maior) e muito menor no verão (caudal de entrada reduzido). O pH da água varia entre pH 6.8 e pH 7.2.

### 1.3-Estrutura e função do manto

O manto de *A. cygnea* é constituído por dois epitélios: o interno ou intrapaleal voltado para o corpo do animal em contacto com a cavidade intrapaleal, e o externo ou extrapaleal voltado para o lado da concha em contacto com a cavidade extrapaleal. Estes dois epitélios estão separados em toda a sua extensão por um tecido conjuntivo onde circula a hemolinfa, mas ao nível do bordo externo encontram-se unidos e formam uma região com três pregas paralelas de características estruturais diferentes. Os estudos realizados por Beedham (1958) e Istín e Masoni (1973) em *A. cygnea* e por Seed (1983) noutros moluscos permitiram descrever



alguns aspectos morfológicos, ultraestruturais e citoquímicos do manto. Conforme se pode observar na Figura I.6a o bordo do manto está subdividido: numa prega externa que segrega o periostraco e a camada calcária externa; numa prega média principalmente sensitiva e numa prega muscular interna que controla o fluxo de água dentro da cavidade do manto. O sulco onde está inserido o periostraco, entre a prega média e a prega externa, é envolvido por dois epitélios diferentes. O epitélio da prega média (face exterior) é constituído por células cúbicas pequenas, de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de altura, enquanto que as células epiteliais da prega externa (face interior) são colunares e altas com cerca de 45  $\mu\text{m}$  de altura. Embora o periostraco esteja aderente à prega média, as células da prega externa parecem ser as únicas responsáveis pela sua secreção. Apresentam um núcleo situado na metade basal, um citoplasma intensamente corado, grânulos espessos na zona distal, provavelmente com polifenóis relativos a proteínas taninadas presentes também no periostraco, ácidos ribonucleicos em concentrações acentuadas e uma distribuição de fosfatase alcalina na superfície que reveste o sulco.

O epitélio externo do manto subjacente às camadas calcáreas externa (prismática) e interna (lamelar) está dividido em duas regiões diferentes. Pensa-se que a região do epitélio correspondente à face exterior da prega externa segrega a camada prismática e a região correspondente à superfície geral do manto (epitélio extrapaleal) segrega a camada lamelar. As células da face exterior da prega externa são basicamente idênticas às da face interior, embora as inclusões granulares sejam menores. A altura das células pode variar entre 20 e 45  $\mu\text{m}$  ou até mesmo 55  $\mu\text{m}$  em



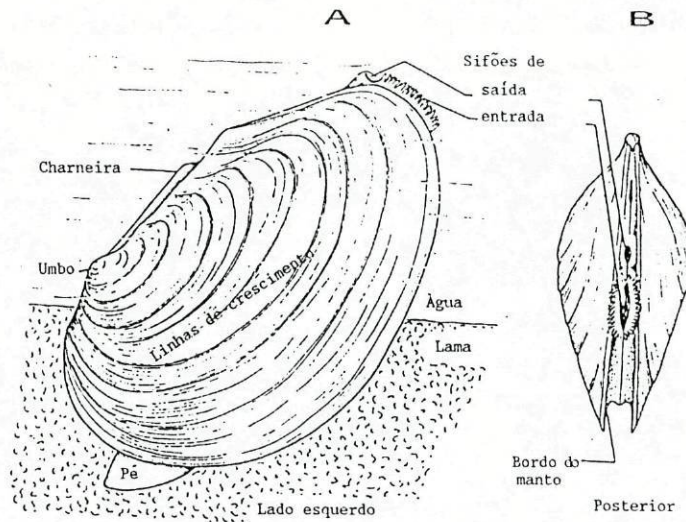


Fig. I.5 - Diagrama mostrando alguns aspectos externos de *A. cygnea* e a posição normal no seu meio ambiente. 5a) Animal imerso parcialmente na lama, inclinado para a face ventral e com a região posterior em contacto com a água. 5b) Região posterior com os sifões de entrada e saída de água e com os bordos do manto unidos (segundo Storer *et al.*, 1979).

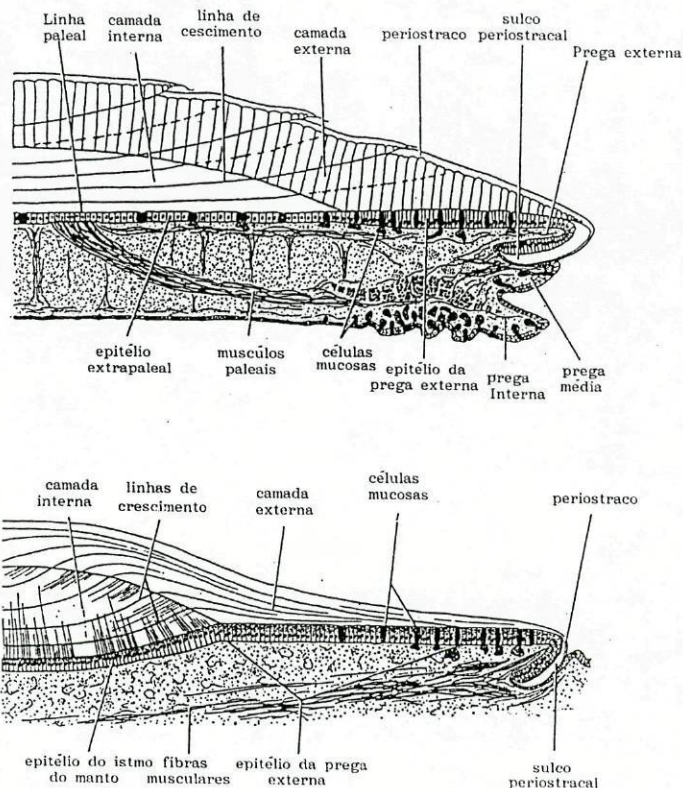


Fig. I.6 - Diagrama da estrutura do manto e da relação deste com a concha em *A. cygnea*. 6a) Corte transversal do manto e da valva. 6b) Corte longitudinal da extremidade posterior do ligamento e do manto subjacente (segundo Beedham, 1958).



regiões de maior actividade. O epitélio da superfície geral do manto está assente sobre um conjunto de feixes espessos de fibras e possui células mais largas e menos altas que as anteriores e um menor número de células secretoras (Fig. I.6a). Na membrana apical destas células há microvilosidades voltadas para a concha. O citoplasma caracteriza-se por um elevado teor de glicogénio e pode-se observar, na região apical da célula, um número abundante de mitocôndrias. Segundo Beedham (1958), as células secretoras desta superfície sintetizam um mucopolissacarídeo neutro. O conhecimento da natureza específica deste mucopolissacarídeo e a caracterização morfológica e ultraestrutural das células pode contribuir grandemente para o conhecimento dos processos de biomineralização da concha. A linha paleal, que limita a cavidade extrapaleal resultante da ligação deste epitélio à concha por inserção dos músculos paleais da prega interna do manto, desenha-se, ao contrário de outras espécies, dentro dos limites da camada calcárea lamelar.

No bordo dorsal e subjacente à região posterior de crescimento do ligamento, o epitélio está estruturado de forma idêntica tendo as camadas do ligamento a mesma origem que as correspondentes camadas das valvas (Fig. I.6b). É de realçar contudo, que a camada calcária interna do ligamento é segregada pelo epitélio do istmo do manto e que a camada calcária externa apresenta uma zona resultante da fusão das superfícies externas das pregas externas. O epitélio da prega externa é aqui também mais alto e apresenta um maior número de células secretoras que o epitélio do istmo do manto. A existência de inclusões granulares no citoplasma das diferentes células sugere que estes epitélios têm



função secretora.

O epitélio interno que reveste a cavidade paleal é constituído por células relativamente baixas e cubóides. As células ricas em produtos de secreção, identificados como mucopolissacárideos ácidos, possuem na membrana apical longos cílios e microvilosidades de dimensões reduzidas e um citoplasma muito vacuolizado. O muco segregado por este epitélio está provavelmente implicado nos processos de selecção das partículas alimentares em que participam fundamentalmente as secreções brânquiais desconhecendo-se contudo, a forma de actuação destes mucos.

O tecido conjuntivo interepitelial, bastante heterogéneo, compõe-se de fibras musculares e conjuntivas que definem espaços hemolinfáticos para onde circula a hemolinfa com células móveis, predominantemente eritrócitos. É interessante realçar que existem dispersos imensos grânulos extracelulares opacos aos feixes de electrões. São grânulos calcários que resultam da deposição alternada e concêntrica de  $\text{CaCO}_3$  e de matriz orgânica.

#### **1.4-Formação da concha**

##### **1.4.1-Mecanismos fisiológicos**

O estudo do crescimento normal e da regeneração da concha de moluscos foi realizado pela primeira vez por Réaumur (1709) que sugeriu ser a formação da concha resultante da actividade secretora do manto. Mais tarde Frémy (1855) descreveu a existência de duas componentes na concha: orgânica e inorgânica. Foi utilizada pela primeira vez a designação de conchiolina para a componente orgânica. Biedermann (1902) sugeriu mesmo que cada camada da concha era segregada por uma área especializada do

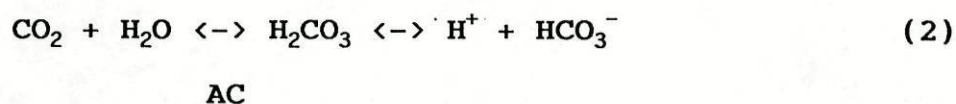
epitélio extrapaleal do manto. Desde então, vários aspectos da formação da concha de moluscos têm sido estudados, como por exemplo a morfologia do manto e da concha, estrutura, calcificação e reparação da concha (Simroth e Hoffmann, 1928; Boggild, 1930; Haas, 1935; Robertson, 1941; Wilbur, 1960, 1964; Grégoire, 1967; Timmermans, 1969). Mais recentemente a descrição da estrutura da concha avançou muito graças às investigações no campo da biomineralização da matriz orgânica (Wilbur, 1976, 1984; Wilbur e Simkiss, 1979; Crenshaw, 1982; Krampitz *et al.*, 1983; Mann, 1983; Weiner *et al.*, 1983; Greenfield *et al.*, 1984; Wheeler e Sikes, 1984). Contudo, ainda que a estrutura da concha seja agora razoavelmente conhecida o mecanismo da sua formação está por esclarecer. Trata-se no entanto, duma área de grande interesse em biologia visto que, para além da sua importância na manutenção da integridade das membranas celulares, o cálcio ocorre em grande quantidade no esqueleto dos animais. Nos animais superiores o cálcio é depositado através de um tecido difuso, de difícil acesso e isolamento. Ao contrário, nos invertebrados e particularmente nos bivalves, o tecido responsável pela deposição do cálcio constitui um modelo de fácil experimentação (Istin 1970).

Os estudos sobre o crescimento em espessura da concha, ao nível da região central do manto, envolvem fundamentalmente três aspectos diferentes: a síntese da matriz orgânica da concha; o transporte iónico através do manto e a nucleação, orientação e crescimento estrutural do complexo cristalino. Os métodos utilizados incluem técnicas de cristalografia por difracção de raio-X e de polarização, histoquímica, bioquímica e de fisiologia

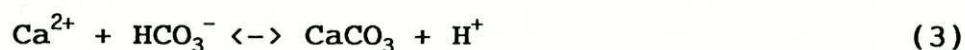


celular. Os resultados obtidos na área da fisiologia celular, mais especificamente da electrofisiologia, tem sido praticamente nulos no que se refere à interpretação dos movimentos iónicos através do manto. Atendendo a que se trata da formação de uma estrutura calcária, desde logo se coloca como hipótese a existência de um transporte activo de cálcio em direcção à concha. Esta sugestão é ainda reforçada se analisarmos a composição iónica dos diferentes compartimentos líquidos de *A. cygnea*. A concentração de cálcio na hemolinfa e no líquido extrapaleal é cerca de quatro vezes a do meio externo (ver Tabela III.1, Capítulo III). Esta hipótese é ainda mais facilmente colocada se nos lembrarmos que existe uma diferença de potencial eléctrico através do manto com o lado mais positivo correspondendo ao líquido extrapaleal em contacto com a face interna da concha (Kirschner *et al.*, 1960; Istín e Maetz, 1964) o que iria contrariar qualquer movimento passivo de cálcio. Segundo Istín e Kirschner (1968) o potencial eléctrico através do manto é gerado na quase totalidade pelo epitélio extrapaleal e mais concretamente pela membrana apical que está em contacto directo com o líquido extrapaleal. Isto leva "a priori" a pensar que o transporte activo de cálcio ocorreria na membrana apical deste epitélio. Contudo, os fluxos realizados com cálcio marcado são consistentes com movimentos passivos (Istín e Maetz, 1964). A capacidade de osmoregulação para os iões sódio, potássio, magnésio e cloro no meio interno (ver Tabela III.1, Capítulo III) dá origem a gradientes electroquímicos transepiteliais e/ou transmembranares que podem interferir nos movimentos de cálcio em direcção à concha. Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de transporte dos restantes iões através do

manto. A partir de uma análise geral pode-se deduzir que a mobilização dos iões  $\text{HCO}_3^-$  necessários ao processo de mineralização da concha e à regulação do pH na hemolinfa, acompanha a mobilização de cálcio em ambos os sentidos. A mobilização no sentido da hemolinfa ou da concha estaria apenas dependente de um gradiente electroquímico criado por factores circunstanciais. Com efeito, segundo Istín e Kirschner (1968) e Wilbur e Saleuddin (1983), pode-se dizer que o fluxo líquido destes iões processar-se-ia no sentido da concha durante o período de deposição, em condições de aerobiose, e no sentido da hemolinfa em condições de anaerobiose, a partir da solubilização do  $\text{CaCO}_3$  recentemente depositado. Os iões  $\text{HCO}_3^-$  presentes na hemolinfa podem ser fornecidos a partir do meio externo (Hammen e Wilbur, 1959) e/ou terem origem na descarboxilação dos compostos do ciclo de Krebs (Martin, 1961) ao nível dos tecidos, em particular do manto, e que se traduz na libertação de  $\text{CO}_2$  celular e consequente hidratação na presença da anidrase carbónica (AC) segundo o esquema:



Os bicarbonatos quando em excesso e em associação com o cálcio, presente na hemolinfa ao nível do manto, podem precipitar formando grânulos calcários extracelulares, descritos por Istín e Girard (1970b), e podem constituir posteriormente fonte de bicarbonatos e de cálcio segundo o esquema:





Esta reacção é reversível e dar-se-à no sentido da deposição ou da ionização conforme é produzido ou removido bicarbonato num processo acelerado pela anidrase carbónica a qual se localiza à superfície dos grânulos (Istin e Girard, 1970b). O sentido desta reacção dependerá das variações de pH na hemolinfa e no líquido extrapaleal (Istin e Masoni, 1973). Esta hipótese embora parecendo mais óbvia, necessita contudo de ser confrontada com a descrição, já referida, das situações de anaerobiose e de aerobiose feitas por Istín e Kirschner (1968) em relação à *A. cygnea* e por Wilbur e Saleuddin (1983) em relação aos moluscos em geral.

A constatação "in vitro" de variações cíclicas na taxa de transporte iónico no epitélio extrapaleal ao longo do ano (Capítulo III) levou a pensar que esta actividade dependeria directamente do metabolismo. Com efeito, ocorrem variações sazonais na actividade metabólica que podem ser consoante as condições ambientais acima descritas, predominantemente aeróbica no outono-inverno ou anaeróbica na primavera-verão. Nos moluscos bivalves, durante a primavera-verão há uma maior incorporação de  $\text{CO}_2$  e uma acentuada acumulação de ácido succínico em vez do ácido láctico (Prosser, 1973; Ahmed e Chaplin, 1979). Durante o outono-inverno haverá taxas de síntese de ATP maiores. Com efeito, em condições de anaerobiose a operação via succinato decorre da carboxilação do fosfoenolpiruvato para oxaloacetato enquanto que em condições de aerobiose a operação via ciclo de Krebs decorre da conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato (Prosser, 1973; Gabbott, 1983). A partir destes dados, Mustafa e Hochachka (1971) postularam que o  $\text{H}^+$  seria um comutador essencial na selecção da via a desenvolver, havendo assim acumulação de succinato quando o pH diminui



e activação do ciclo de Krebs quando o pH aumenta (Fig. I.7). Qualquer acumulação de alanina em anaerobiose potenciará o efeito do pH. Parece óbvio que o relacionamento entre a actividade metabólica e a actividade de transporte iónico ao nível do manto pode levar a uma melhor compreensão do ciclo normal de calcificação ao longo do ano.

Das raras experiências realizadas por métodos electrofisiológicos no manto de *A. cygnea*, e publicadas antes dos trabalhos descritos nesta tese, muito pouco se consegue extrair no sentido de explicar os mecanismos de transporte iónico que assistem à formação da concha. Deste modo, é pertinente fazer um estudo electrofisiológico pormenorizado do epitélio extrapaleal (barreira entre a hemolinfa e a concha) de forma a elaborar um modelo de transporte transepitelial. Há ainda todo o interesse em relacionar as taxas de transporte iónico, com as taxas de calcificação da concha, variações do pH extracelular e graus de hipóxia por que o animal passa durante o ano.

#### 1.4.2-Cristalização

O líquido extrapaleal, de pequeno volume (cerca de 1-2 mililitros), é uma solução complexa composta de substâncias inorgânicas e orgânicas dentro de um compartimento fechado e cujo pH pode situar-se entre 7.0 e 8.3 (Wilbur, 1964; Wilbur e Saleuddin, 1988). Os iões inorgânicos estão em concentração idêntica aos da hemolinfa (ver Tabela I.1, Capítulo III) donde derivam provavelmente por difusão através do epitélio extrapaleal. Os compostos orgânicos compreendem vários aminoácidos (cerca de 19), proteínas, mucopolissacarídeos neutros e ácidos orgânicos (Gre-



goire *et al.*, 1955; Durning, 1957; Abolins-Krogis, 1963; Wilbur, 1964) sob a forma solúvel no estado inicial e que, uma vez depositados, constituem em conjunto a matriz orgânica da concha (conchiolina). Estes compostos provêm muito provavelmente da hemolinfa e das células do epitélio extrapaleal. A ocorrência deles no líquido extrapaleal pode ser específica para cada espécie animal o que determina naturalmente o tipo de cristal a formar (Kitano *et al.*, 1969; Wilbur e Saleuddin, 1983). Em *A. cygnea* Beedham (1954) detectou na matriz orgânica a presença de um mucopolissacarídeo neutro, alanina, ácido aspártico e principalmente arginina. Atendendo aos progressos recentes nos estudos da relação entre a matriz orgânica e os fenómenos de biomineralização e de cristalização na concha (fenómenos epitáxicos), desde logo este aspecto mereceu particular interesse no presente trabalho. Com efeito, estes fenómenos são ainda mal conhecidos em *A. cygnea*; a natureza específica e a função do muco sintetizado pelas células secretoras está também por determinar e esclarecer.

Para que o processo de cristalização se efectue é necessário que o líquido extrapaleal esteja supersaturado com  $\text{CaCO}_3$ , que o  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{HCO}_3^-$  continuem a ser fornecidos pelo manto, que se formem aglomerados iónicos de tamanho crítico e que a matriz contenha compostos orgânicos capazes de desenvolverem, por associação, núcleos cristalinos (Neuman e Neuman, 1958; Garside, 1982; Wilbur e Saleuddin, 1983). Alguns dos estudos recentes visam a determinação da natureza específica das substâncias orgânicas capazes de iniciar a nucleação dos cristais de  $\text{CaCO}_3$  (Crenshaw, 1972b; Weiner e Hood, 1975; Crenshaw e Ristedt, 1976; Krampitz *et al.*, 1976; Weiner, 1979; Samata *et al.*, 1980; Weiner e Traub, 1981).



De um modo geral, admite-se a existência de duas fracções proteicas na matriz: uma proteína de suporte à qual se liga uma fracção polipeptídica designada por matriz mineralizante com uma forte afinidade para os iões de cálcio (Degens, 1976). Pensa-se que a fracção mineralizante quando activada pela ligação à proteína de suporte possa nuclear os cristais de  $\text{CaCO}_3$  à qual se segue uma deposição epitaxial destes cristais (Degens, 1976). Uma vez formado o núcleo cristalino sobre a matriz orgânica ele torna-se cada vez maior adquirindo predominantemente a forma de uma placa cujos bordos desenhavam um polígono hexagonal. Finalmente, devido a um crescimento contínuo, os cristais tornam-se contíguos e formam uma lamela em mosaico. Um crescimento em espiral pode ocorrer por deslocamentos em parafuso sobre a face larga dos cristais maiores (Wada, 1961). Durante o processo de cristalização, o crescimento em espessura (ao longo do eixo c) cessará pela secreção de uma nova camada de matriz mineralizante continuando contudo o seu crescimento em superfície (ao longo do eixo a e b) (Fig. I.8). O comprimento e a largura dos cristais dependerá do número de cristais por unidade de área. Segundo Crenshaw e Ristedt (1976) e Crenshaw (1982) a matriz tem a função dupla de facilitar e inibir o crescimento do cristal. Durante um período de calcificação formam-se várias lamelas calcárias intercaladas com a matriz orgânica. A orientação dos cristais na camada nacarada tem sido atribuída à matriz onde se desenvolvem, havendo também uma influência recíproca destes cristais na orientação das moléculas da matriz (Wilbur, 1976; Wilbur e Saleuddin, 1983). Isto resulta numa orientação uniforme das lamelas da camada nacarada. O tipo de cristal a desenvolver poderá depender da



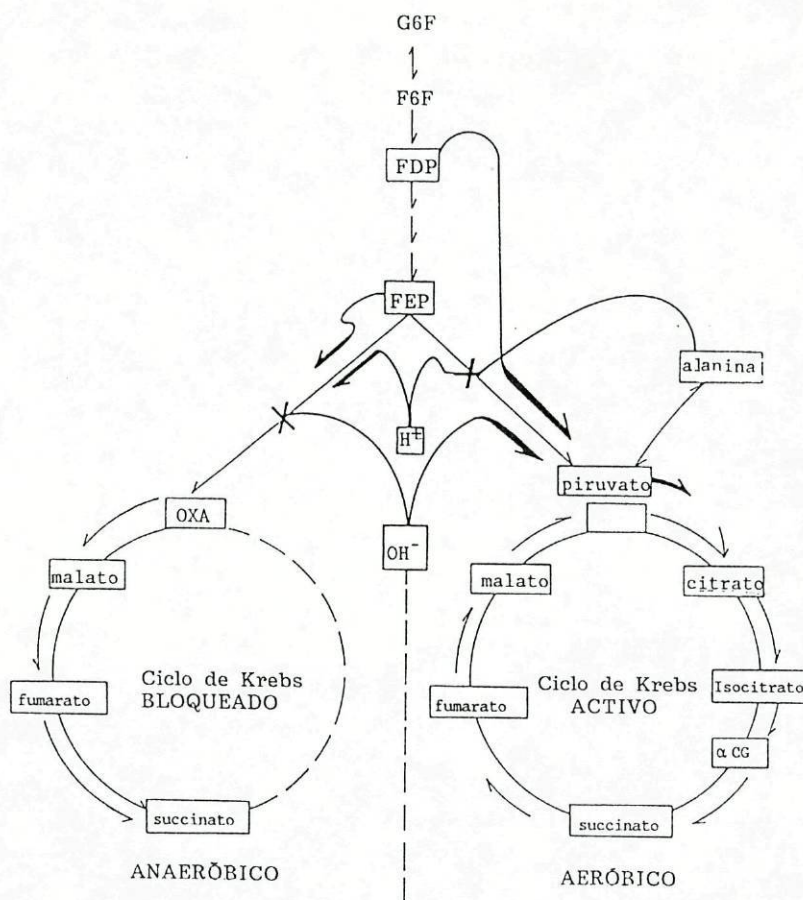


Fig. I.7 - Mecanismos alternativos do metabolismo nos tecidos da ostra em condições de aerobiose e anaerobiose (segundo Prosser, 1973).

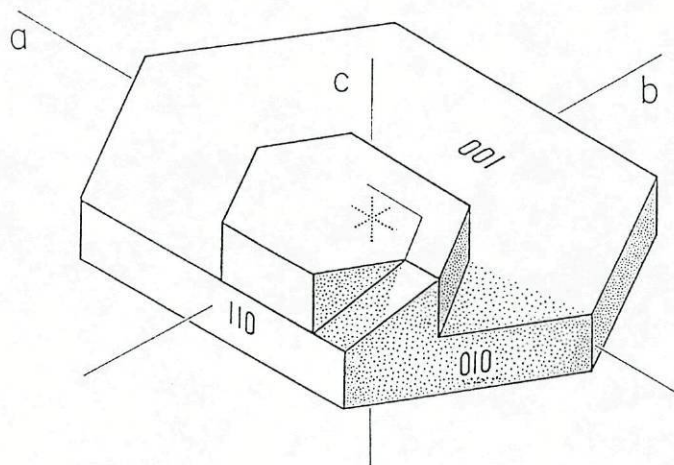
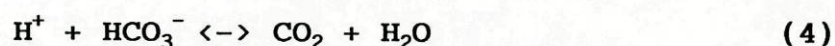


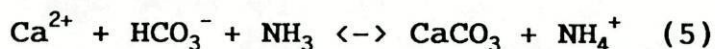
Fig. I.8 - Diagrama tridimensional duma deslocação em parafuso de um cristal hexagonal com eixos cristalográficos: a, b, c; e faces: 001, 110, 010. A matriz orgânica limita o crescimento ao longo do eixo c; discontinuidades da matriz permite a continuação de crescimento do cristal segundo o eixo c formando um novo cristal com eixos e faces correspondentes à do cristal subjacente (segundo Blackwell et al., 1977).

estrutura da matriz e do tipo de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no fluido extrapaleal (Wilbur, 1964; Kitano *et al.*, 1969, 1976). Consoante as espécies de moluscos, podem ocorrer cristais de calcite, aragonite e aragonite e calcite em simultâneo. Em *A. cygnea* o cristal mais típico é a aragonite. Vários factores poderão interferir na forma como estes mecanismos decorrem. Como é óbvio um pH alcalino é favorável a uma deposição de  $\text{CaCO}_3$ . O contrário pode ocorrer quando na matriz solúvel e no fluido extrapaleal existem cadeias polipeptídicas com grupos  $\text{COO}^-$  (Weiner e Hood, 1975; Weiner, 1979). Um outro factor autolimitante é a própria formação de  $\text{CaCO}_3$  a partir de  $\text{Ca}^{++}$  e de  $\text{HCO}_3^-$  a qual resulta na libertação de protões baixando assim o pH do líquido extrapaleal e dificultando posteriormente a sua precipitação (Wilbur e Saleuddin, 1983). A remoção destes protões poderá processar-se através da reacção com os bicarbonatos na presença da anidrase carbónica (Wheeler, 1975) segundo o esquema:



Por sua vez, o  $\text{CO}_2$  seria removido do líquido extrapaleal para a hemolinfa por difusão através do epitélio extrapaleal em função do seu gradiente favorecendo a reacção (4) no sentido da direita (Wilbur e Saleuddin, 1983). Esta hipótese tem o inconveniente de implicar a redução da quantidade de bicarbonatos disponíveis para precipitação do cálcio. Uma segunda hipótese consistiria na formação de amónia (Campbell e Boyan, 1976; Loest, 1979a; 1979b) segundo o esquema:





Consequentemente, teria de ocorrer a difusão de  $\text{NH}_4^+$  para a hemolinfa ou a sua incorporação nos elementos de cristalização a fim de evitar a sua acumulação no líquido extrapaleal. Na realidade foram detectados por Florkin e Houet (1938) 51-71 $\mu\text{g}$  de amônia em 100ml de hemolinfa de *A. cygnea*. Contudo, segundo Simkiss (1976) este mecanismo de remoção dos prótons tem o inconveniente de postular a formação de  $\text{NH}_4^+$ , que por ser carregado dificilmente atravessa as membranas plasmáticas.

Os conhecimentos sobre os mecanismos que controlam o processo de cristalização da concha em moluscos encontram-se ainda numa fase inicial, pelo que novas informações nesta área são potencialmente relevantes. Assim, o estudo sobre os efeitos de poluentes específicos poderá contribuir para o esclarecimento de alguns aspectos e para o reforço de outros, devido à sua interferência nos processos de calcificação quer através da inibição da síntese de matriz orgânica quer através do bloqueio dos mecanismos de transporte transepitelial.

## 2-PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ELECTROFISIOLOGIA

### 2.1-Membrana celular

Os organismos vivos regulam o volume, a composição e o pH do meio intracelular controlando a sua actividade metabólica e as trocas com o meio ambiente através das membranas celulares que funcionam como barreiras de permeabilidade altamente selectiva. As trocas de pequenas moléculas e iões entre as células e o meio circundante são em geral mediadas por sistemas de transporte específico e implicam um consumo de energia livre, armazenada sob a forma de ATP intracelular, de gradientes de concentração e/ou de potencial eléctrico.

As membranas biológicas são predominantemente constituídas por fosfolípidos e proteínas em proporções variáveis consoante o tipo de célula. O modelo de organização membranar mais característico consiste numa bicamada fosfolipídica em que os grupos polares contendo fosfatos se encontram voltados para o exterior da camada, em contacto por interacção electrostática, com as moléculas de água também polares. As regiões neutras hidrofóbicas (cadeias alifáticas) estão dispostas paralelamente umas às outras no interior da membrana (Cerejido e Rotunno, 1970; Ferreira e Marshall, 1985). A permeabilidade da bicamada lipídica às substâncias lipo-solúveis será maior em membranas constituídas por fosfolípidos insaturados por serem mais fluidas, reduzindo-se a fluidez com o aumento de moléculas de colesterol inseridas entre os fosfolípidos (Ferreira e Marshall, 1985). A permeação duma molécula através das zonas lipídicas da membrana decorre em três passos sucessivos. O primeiro será a partilha da molécula entre



a água e a fase lipídica da membrana. O segundo é a difusão através da camada lipídica. O terceiro é de novo a partilha entre a fase lipídica e a água do compartimento oposto. A permeabilidade da bicamada lipídica a pequenos iões é muito reduzida devido ao coeficiente de partilha ser muito baixo ou seja a energia necessária para transferir um ião da água com uma constante dieléctrica elevada (cerca de 80) para um lípido com uma constante dieléctrica baixa (2-5) é enorme. A permeabilidade para um dado ião, que se pode inferir a partir de medições da sua condutância, não é necessariamente a mesma que se obtem a partir da medição de fluxos de radioisótopos de iões porque o mecanismo de translocação através da membrana pode ser electricamente silencioso. São exemplos deste tipo de transporte as trocas iónicas mediadas por antiportes ou contra-transportes ou por certos simportes ou co-transportes de sódio, potássio e cloro.

## 2.2-Difusão simples e facilitada

A força motriz que condiciona a difusão simples duma dada substância através da membrana celular é proporcional ao gradiente químico ou electroquímico conforme se trata de moléculas neutras ou iões ("downhill transport"). O fluxo difusional de uma espécie molecular será tanto maior quanto maior for a permeabilidade da membrana celular a essa substância sendo a permeabilidade proporcional ao seu coeficiente de difusão na fase lipídica (Cerejido e Rotunno, 1970). Quando a permeabilidade (a iões ou a moléculas polares) é maior do que seria de esperar a partir do coeficiente de partilha água/lípido e do coeficiente de difusão na fase lipídica diz-se que há uma difusão facilitada ou mediada.



A difusão facilitada pode ser mediada por transportadores ou por poros não criando gradientes de concentração através de membranas a menos que medie o fluxo simultâneo de duas ou mais espécies moleculares. Os fluxos difusionais mediados por transportadores dependem da quantidade de transportador combinado, da velocidade de formação do complexo transportador-substrato, da velocidade de transporte do complexo através da membrana, da velocidade de dissociação e da velocidade de retorno do transportador livre (Cerejido e Rotunno, 1970). A difusão facilitada é razoavelmente selectiva dependendo da afinidade entre o transportador e a espécie transportada (substrato). Quando a afinidade entre o transportador e o substrato é elevada e quando a concentração de substrato é grande pode haver saturação do transportador (Cerejido e Rotunno, 1970; Stryer, 1988). Os poros podem descriminar moléculas com base no seu tamanho, forma e carga. A cinética de penetração através dos poros também pode exibir saturação. Quando duas substâncias diferentes atravessam o mesmo poro pode ocorrer uma inibição competitiva (Cerejido e Rotunno, 1970; Stryer, 1988). Alguns microorganismos sintetizam antibióticos solúveis em lípidos que permeabilizam membranas a certos iões (ionóforos). Os ionóforos podem funcionar como transportadores ou podem gerar poros. São exemplos típicos destes antibióticos a valinomicina que funciona como um transportador de iões através da membrana e a gramicidina que forma canais por onde passam os iões através da membrana (Stryer, 1988; Ferreira e Marshall, 1985) (Fig. I.9).



### 2.3-Transporte contra-gradientes ("uphill transport")

Na natureza as membranas celulares separam compartimentos de diferentes composições. Há portanto gradientes transmembranares das espécies moleculares presentes nesses compartimentos que podem ser químicos (moléculas neutras) e electroquímicos (iões). Quando estes gradientes não se dissipam está-se em presença de mecanismos especializados capazes de transportarem solutos contra os seus gradientes químicos ou electroquímicos. O transporte contra-gradiente implica a sua associação a um outro processo que funciona como "fonte" de energia livre e que pode ser a hidrólise de ATP ou um fluxo a favor do gradiente electroquímico de outro ião ou molécula polarizada (Ferreira e Marshall, 1985).

Se o transporte contra gradiente está directamente associado à hidrólise de ATP, o sistema de transporte é designado por "bomba" (transporte activo). Existem vários destes sistemas activos em biologia mas a "bomba" de Na/K é provavelmente a mais bem conhecida. No glóbulo vermelho esta "bomba" troca três sódios para o exterior por dois potássios para o interior por cada molécula de ATP gasta (Stryer, 1988). Oleg Jardetzky propôs um modelo (Fig. 10) segundo a qual a proteína responsável pelo transporte deveria preencher três condições estruturais para funcionar como uma bomba: 1) deve possuir uma cavidade de tamanho suficiente para admitir uma pequena molécula ou ião; 2) deve ser capaz de assumir duas conformações tais que a cavidade tenha uma forma para o interior da célula e outra para o exterior; 3) a afinidade para as espécies transportadas deve ser diferente nas duas conformações.

Existem ainda mecanismos especializados que medeiam um trans-

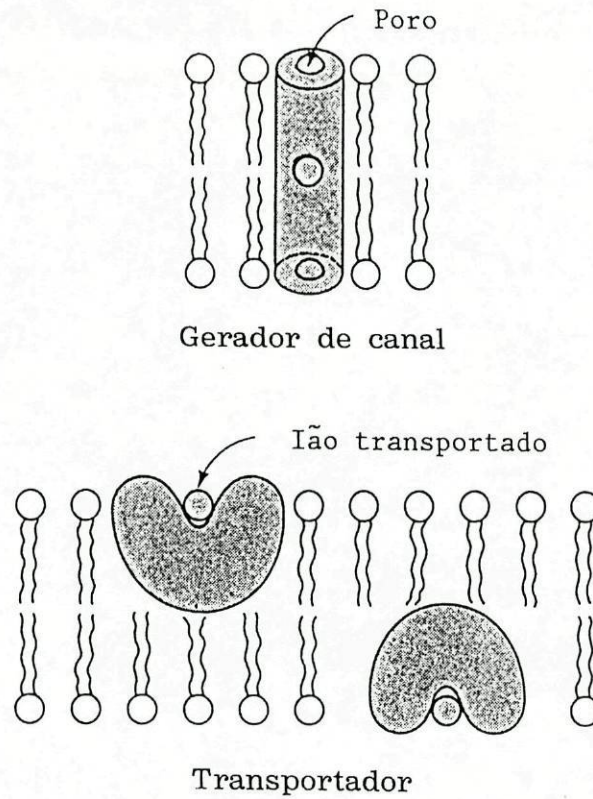


Fig. I.9 - Comparação esquemática de um gerador de canal com um transportador de iões (segundo Stryer, 1988).

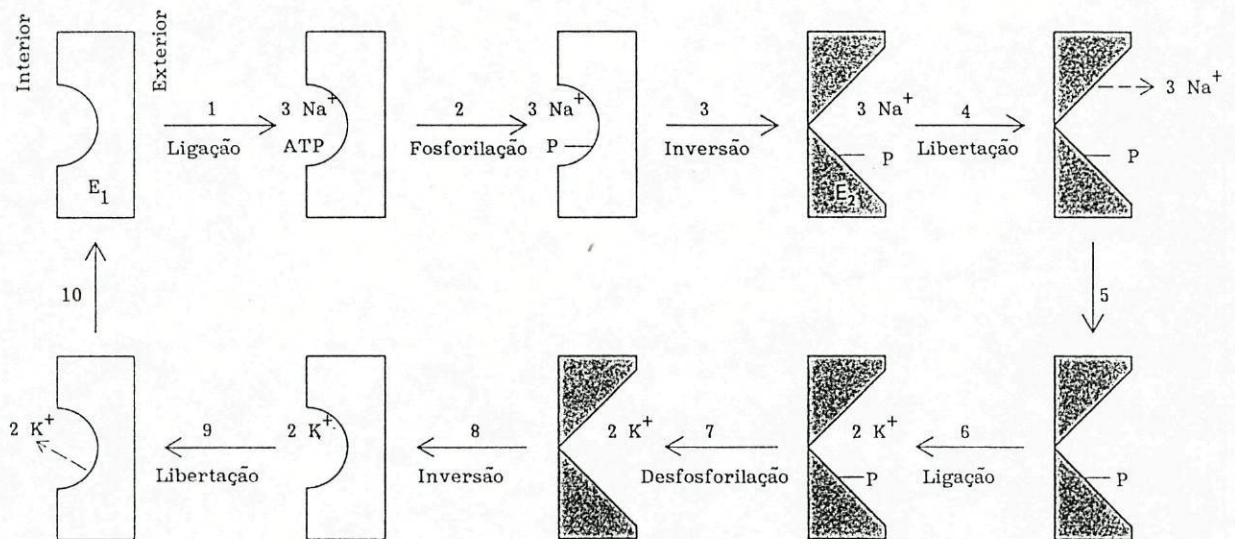


Fig. I.10 - Diagrama de um mecanismo proposto para a "bomba" de Na/K. As reacções superiores referem-se à saída de sódio enquanto as inferiores referem-se à entrada de potássio. Ambas as sequências de reacções implicam mudanças de conformação no transportador (segundo Stryer, 1988).



porte contra gradiente à custa de outro fluxo devido a um gradiente químico ou electroquímico favorável. Este processo é conhecido por conjugação de fluxos ("flux coupling"). Ao movimento concertado destas duas espécies chama-se cotransporte ou simporte se as duas espécies se movem no mesmo sentido e contra-transporte ou antiporte se em sentidos opostos. Foram identificados vários mecanismos deste tipo em células animais, de que é um exemplo, o transporte de glucose-Na no intestino delgado e no tubo renal. A conjugação directa de fluxos pode gerar gradientes químicos ou electroquímicos (transporte activo secundário) sendo contudo a força motriz geradora destes gradientes o resultado de gradientes previamente criados pela actividade de uma bomba.

#### 2.4-Potenciais electroquímicos transmembranares

Se por hipótese admitirmos a existência de duas soluções neutras, mas diferentes na sua composição, separadas por uma membrana permeável apenas a uma espécie iónica o gradiente electroquímico da espécie permeante dá origem a uma diferença de potencial eléctrico através da membrana (Ferreira e Marshall, 1985). A difusão do ião permeável processar-se-á até que o potencial eléctrico gerado através da barreira seja suficiente para travar o fluxo (Ferreira e Marshall, 1985). Em equilíbrio o gradiente electroquímico da espécie permeante é nulo e haverá uma diferença de cargas que corresponderá ao potencial eléctrico. Caso a membrana seja permeável a mais do que uma espécie iónica (iões positivos e negativos) pode não se atingir o equilíbrio (Ferreira e Marshall, 1985). Deste modo, a diferença de potencial eléctrico membranar pode ser considerada uma variável dependente



dos valores de concentração e dos fluxos iónicos que podem ser determinados pelo método de traçadores isotópicos (Ussing, 1960). É possível calcular aproximadamente o potencial eléctrico membranar a partir do conhecimento das permeabilidades iónicas e dos gradientes químicos (Teorell, 1953). Numa primeira aproximação pode escrever-se para uma dada espécie molecular ou iónica:

$$\text{densidade de fluxo} = \text{mobilidade} \cdot \text{concentração} \cdot \text{força motriz} \quad (6)$$

em que a densidade do fluxo é o fluxo por unidade de superfície de membrana; a concentração é o número de moles por  $\text{cm}^3$  no ponto em que o fluxo é medido; a força motriz é o gradiente químico ou electroquímico e a mobilidade é a velocidade local por unidade de gradiente da espécie molecular. Esta relação pode ser aplicada ao estudo de membranas biológicas visto serem também barreiras semipermeáveis. De acordo com Nernst e Plank a força motriz é uma soma algébrica de todas as forças que actuam sobre a membrana. Essas forças são proporcionais ao:

1) gradiente de potencial químico ( $dc/dx$ ). Utiliza-se gradiente de concentração em vez de actividade química dado não ser fácil a determinação da actividade. Convenciona-se atribuir o valor de 1 ao coeficiente de actividade dos solutos citoplasmáticos; 2) gradiente de potencial eléctrico  $dV/dx$ ; 3) gradiente de pressão  $dP/dx$ . A força total resultante é representada por um gradiente de potencial electro-químico. A partir destes parâmetros e com base na relação anterior (6) poder-se-á deduzir a equação de Nernst-Plank onde  $u'$  é a mobilidade iónica,  $c$  a concentração,  $R$  a constante dos gases,  $T$  a temperatura absoluta,  $Z$  a valência,



F a constante de Faraday, V o potencial eléctrico e onde se admite não haver gradiente de pressão hidrostática ( $dP/dx=0$ ).

Então:

$$J' = -u'RT.c. \left( \frac{dc}{c.dx} + \frac{ZF}{RT} \cdot \frac{dV}{dx} \right) \quad (7)$$

Esta equação é importante por descrever a densidade de fluxo (J) de um ião ( $\text{mol.cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ) num meio homogéneo e por constituir o ponto de partida para a derivação de equações que descrevem o fluxo de iões através de membranas e barreiras em situações específicas (Cerejido e Rotunno, 1970; Ferreira e Marshall, 1985).

Quando a membrana é permeável apenas a um ião em equilíbrio a integração para a equação de Nernst é de particular importância e é expressa por:

$$E = \frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{C_i}{C_e} \quad (8)$$

onde se utilizam as concentrações  $C_i$  (interna) e  $C_e$  (externa) do ião em vez de actividades. Esta equação é largamente utilizada para calcular potenciais de membrana a partir dos gradientes de concentração iónica e descrever os movimentos de iões através de membranas (Ferreira e Marshall, 1985). Caso não haja correspondência entre o potencial de membrana e o gradiente de concentração não existirá equilíbrio podendo significar que o ião em questão é transportado activamente (Cerejido e Rotunno, 1970).

Os casos em que há mais do que uma espécie iónica transportada exigem um tratamento diferente. A equação de Goldman é a aproximação mais frequentemente usada em que se postula que o



gradiente de potencial eléctrico através da membrana tem um perfil linear. Segundo a equação de Goldman a diferença de potencial através de uma membrana é função das concentrações dos iões presentes e da permeabilidade da membrana a esses iões (Ussing, 1960). A partir da equação de Goldman é possível derivar a versão de Hodgkin-Katz onde a diferença de potencial é dada em função das concentrações em ambos os lados da membrana e das permeabilidades aos iões em presença (Ussing, 1960; Cerejido e Rotunno, 1970; Ferreira e Marshall, 1985): Se apenas houver nas soluções sódio, potássio e cloro teremos que:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}C_{Na,i} + P_KC_{K,i} + P_{Cl}C_{Cl,o}}{P_{Na}C_{Na,o} + P_KC_{K,o} + P_{Cl}C_{Cl,i}} \quad (9)$$

Esta equação tem sido muito útil na descrição de fenómenos electrofisiológicos de membranas. Segundo Ussing (1960) a partir desta expressão chega-se a um conceito básico de que as diferenças de potenciais transmembranares são o resultado quase exclusivo dos potenciais de difusão traduzindo gradientes e permeabilidades diferentes a um pequeno número de iões entre os quais os iões K e Na são os mais importantes.

## 2.5-Implicações electrofisiológicas da "bomba"

Apesar dos potenciais bioeléctricos serem deduzidos directamente de um somatório de potenciais de difusão eles só existirão quando houver pelo menos um transporte activo que cria e mantém um ou mais gradientes de concentração iónica (Ussing, 1960; Cerejido e Rotunno, 1970; Ferreira e Marshall, 1985). Há situações em que a intervenção da "bomba" na génese dos potenciais eléctricos



cos é directa pela transferência líquida de uma carga através da membrana. Esta electrogenicidade da "bomba" pode ser testada pelo uso de um inibidor específico como por exemplo a ubaína (Cerejido e Rotunno, 1970; Ferreira e Marshall, 1985). Na natureza a fracção lipídica das membranas biológicas é praticamente impermeável a pequenos iões o que implica a existência de "bombas" para manter gradientes electroquímicos e de poros ou canais membranares para mediar os fluxos passivos que por sua vez dão origem ao potencial eléctrico através da membrana.

## 2.6-Epitélios

Nos organismos superiores os epitélios constituem camadas contínuas de células, simples ou múltiplas, formando barreiras funcionais entre os espaços intersticiais e o meio externo ou cavidades internas (como por exemplo os ductos urinários). As substâncias podem atravessar epitélios quer através das membranas celulares e do citoplasma (via transcelular), quer através dos espaços intercelulares (via paracelular) ou ainda no interior de vesículas membranosas (pinocitose). Uma característica fundamental a realçar é a assimetria existente nas células epiteliais. Com efeito a membrana que separa o meio intracelular do meio intersticial (membrana basolateral) é sede de mecanismos de transporte diferentes dos que se processam na membrana que separa o meio intracelular do meio luminal ou externo (barreira apical). Esta assimetria é possível graças à presença de complexos juncionais na periferia da membrana apical formando um sistema contínuo em torno das células que impede a difusão transversal dos componentes das membranas e separa as membranas apical e basolateral.



Schafer e DiBona (1984) referem que estas zonas de oclusão impedem os movimentos das proteínas intrínsecas das membranas de tal modo que os componentes específicos da membrana apical não podem difundir ao longo da bicamada bilipídica para a face basolateral ou viceversa. Isto conduz a uma polarização das células epiteliais com enzimas e locais de transporte diferentes nas duas membranas. Segundo Schafer e DiBona (1984) resultados de numerosas investigações sobre a "bomba" de Na mostraram que se localiza em geral na barreira basolateral. A assimetria anatômica e funcional das células epiteliais confere direccionalidade ao transporte de solutos de um lado para o outro. De um modo geral a movimentação de substâncias entre o exterior e o meio interno está dificultada ao nível dos complexos juncionais enquanto que existe uma baixa resistência entre os citoplasmas de células vizinhas (Loewenstein e Kanno, 1967; Loewenstein e Penn, 1967).

## 2.7-Transporte de água através de epitélios

O transporte de água é basicamente um mecanismo passivo conjugado com o movimento ou distribuição do soluto através do epitélio (Cerejido e Rotunno, 1970). Epitélios de alta resistência em que a via paracelular tem uma permeabilidade iónica muito baixa (pele da rã, colon, tubo distal) a permeabilidade à água é também pequena. Os epitélios de baixa resistência (intestino delgado, tubo proximal) separam compartimentos isotónicos e exibem conductividades hidráulicas elevadas (Schafer e DiBona, 1984). Nalguns epitélios, em condições fisiológicas normais, admite-se que há um fluxo dominante de NaCl sendo o  $\text{Na}^+$  transportado activamente até ao espaço intercelular e o  $\text{Cl}^-$  passivamente



arrastado afim de manter a electroneutralidade do soluto (Cerejido e Rotunno, 1970). Mais recentemente (Willumsem e Larsen, 1986) verificou-se, no caso da pele da rã que o fluxo transepitelial de cloro é regulado pela voltagem e processa-se através de células especiais chamadas "células em frasco" ou "células ricas em mitocôndrias". Para explicar o transporte de água na vesícula biliar, Diamond e Brossert propuseram um modelo de osmose local em que existe um gradiente constante no espaço intercelular. Segundo este modelo (Fig. I.11), a bombagem activa de  $\text{Na}^+$  seguida de um transporte passivo de  $\text{Cl}^-$  para o interior dos espaços intercelulares a partir da célula, resulta numa hipertonicidade local dessa região em relação à tonicidade do meio externo, especialmente próximo das extremidades apicais justapostas onde se presume estar a funcionar o transporte activo. O aumento resultante de pressão hidrostática dentro dos espaços produzirá um fluxo de solução ao longo do espaço intercelular (via paracelular) em direcção às extremidades basais abertas. Como esta zona é altamente permeável a solutos, nenhum gradiente osmótico se forma nesta região. Assim a osmolalidade do fluido no espaço intercelular poderá decrescer ao longo do seu comprimento até que o fluido emergente se aproxima da isotonicidade. Contudo, segundo Schafer e DiBona (1984) estes mecanismos são questionáveis relativamente aos epitélios de baixa resistência. Primeiro, porque os espaços intercelulares laterais nas extremidades apicais não estão fechados ao transporte de solutos. Os complexos juncionais são permeáveis a iões e pequenos solutos, e esta permeabilidade facilitará a dissipação do gradiente osmótico constante. Segundo, não há nenhuma base experimental para situar preferencialmente



o transporte activo de solutos dentro das extremidades justapostas dos espaços. Finalmente, porque a geometria destes espaços não é suficientemente limitativa para impedir uma difusão do soluto relevante. Deste modo, qualquer gradiente de concentração do soluto tenderá a desaparecer por difusão. Por outras palavras, a elevada permeabilidade à água dos epitélios de baixa resistência apenas exige pequenas diferenças de osmolidade para que se dê um rápido fluxo de volume.

## 2.8-Potencial eléctrico transepitelial e correntes iónicas

A maioria dos epitélios desenvolve uma diferença de potencial, entre o compartimento basolateral e compartimento apical, que reflecte as propriedades de transporte iónico do epitélio cuja interpretação nem sempre é fácil. A geração da voltagem é normalmente associada à existência de uma "bomba" numa das barreiras celulares mas uma grande parte do potencial dependerá de outros factores não sendo por isso a amplitude do potencial uma indicação directa da actividade da "bomba" (Schafer e DiBona, 1984). Usando o modelo originalmente descrito por Ussing estes mesmos autores propõem que a diferença de potencial transepitelial ( $V_e$ ) corresponderá fundamentalmente à soma da voltagem da membrana basolateral ( $V_b$ , célula-interstício) e a voltagem da membrana apical ( $V_a$ , célula-lúmen). Normalmente a voltagem da membrana basolateral é em grande parte determinada pelos potenciais de difusão (Nernst) para cada um dos iões através da membrana e respectivas condutâncias com diferenças acentuadas em relação à membrana apical (Schafer e DiBona, 1984). Os potenci-



ais intracelulares gerados através de cada uma das barreiras celulares, podem ser medidos experimentalmente com microelétrodos. A voltagem transepitelial é também determinada pela permeabilidade iônica da via paracelular. Condutâncias paracelulares muito elevadas conduzem a diferenças de potencial eléctrico entre a solução apical e basolateral muito baixas (Schafer e DiBona, 1984). Deste modo, segundo estes autores, os potenciais transepiteliais serão a expressão dos potenciais parciais e ainda das resistências membranares ( $R_a$  e  $R_b$ ) e da via paracelular ( $R_p$ ) (espaços intercelulares e complexos juncionais). Um circuito equivalente muito simples de um epitélio está representado na Figura I.12. Para este epitélio é fácil mostrar que:

$$V_e = \frac{R_p(V_b - V_a)}{R_a + R_b + R_p} \quad (10)$$

As correntes iônicas transepiteliais responsáveis pela génese da diferença de potencial total ( $V_e$ ) poderão ser quantificadas com base numa técnica de curto-circuito ("voltage clamp") desenvolvida por Ussing e Zerahn (1951) (Fig. I.13a, I.13b, I.13c) com a utilização simultânea de radioisótopos em solução quando em condições estacionárias e com soluções idênticas em ambos os lados do epitélio. A preparação epitelial (P) é colocada entre as duas câmaras de perspex ( $C_1$  e  $C_2$ ) como uma barreira que separa dois compartimentos aquosos. Duas pontes de Ringer-Agar ( $A_1$  e  $A_2$ ) partem das regiões vizinhas de cada lado da preparação. As extremidades exteriores das pontes estabelecem ligação com eléctrodos calomelanos ( $E_1$  e  $E_2$ ) através de uma solução de KCl

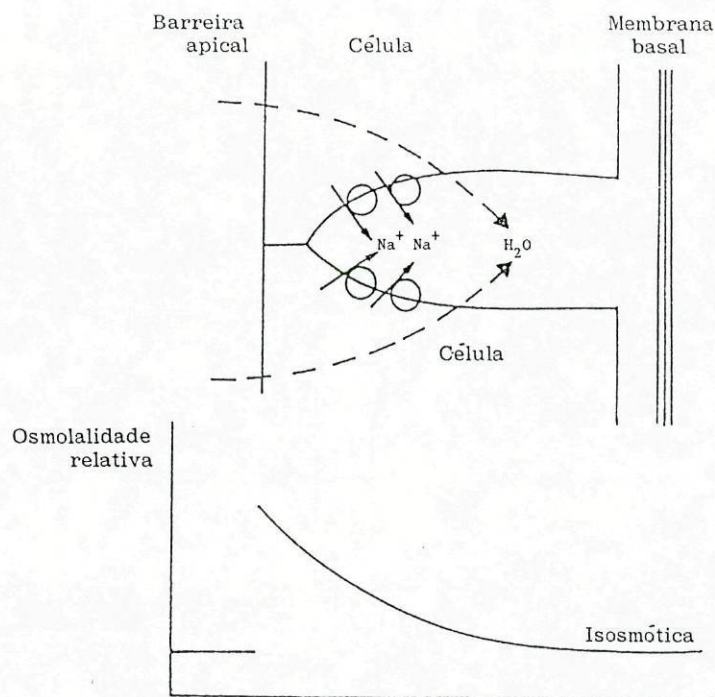


Fig. I.11 - Modelo de osmose local segundo o qual uma hipertoncidade local gerada por uma bombagem activa de sódio para o espaço intercelular provocará um arrastamento de água causando um fluxo de solução ao longo do espaço intercelular para as extremidades basais abertas. Isto resultará num fluido de osmolalidade decrescente ao longo do canal intercelular (segundo Schafer e DiBona, 1984).

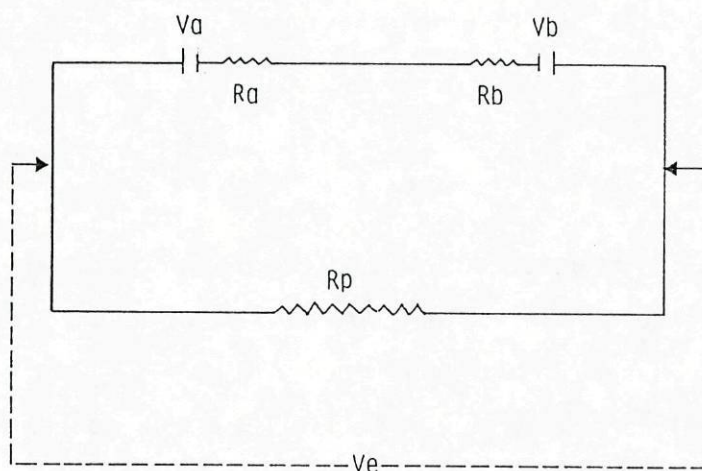
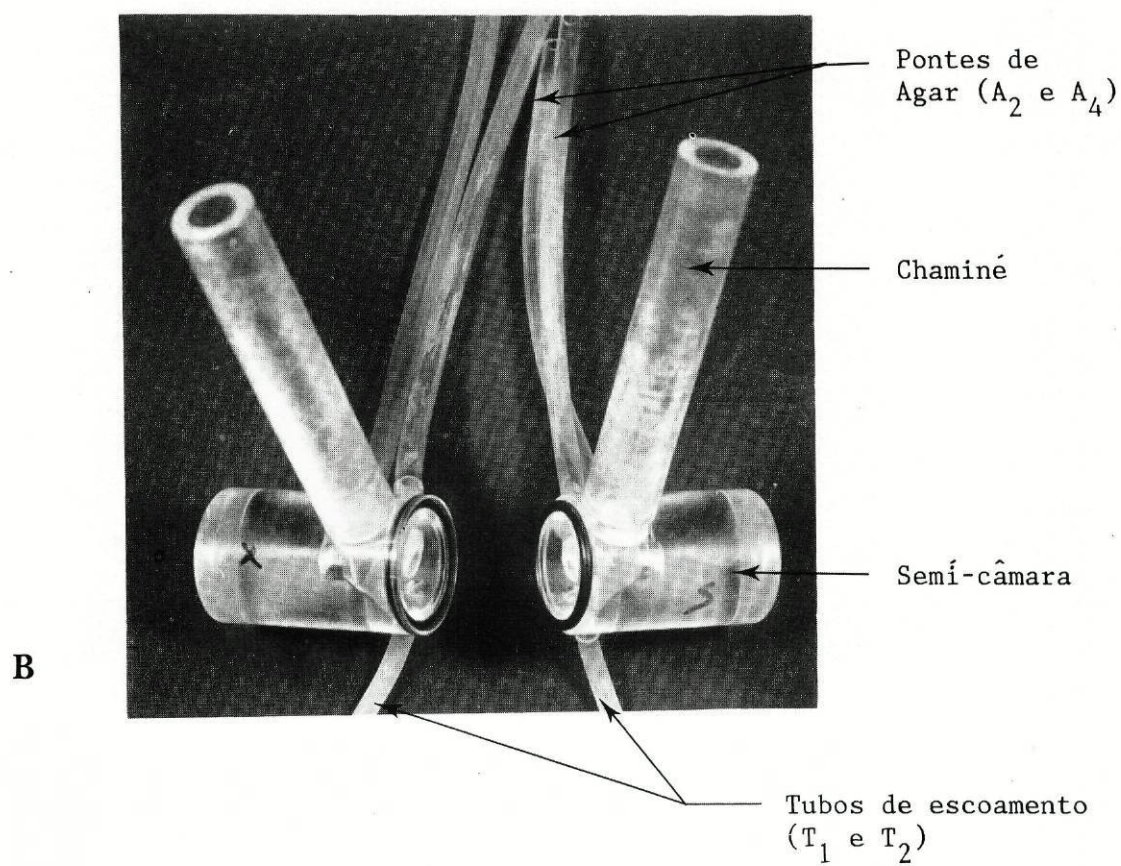
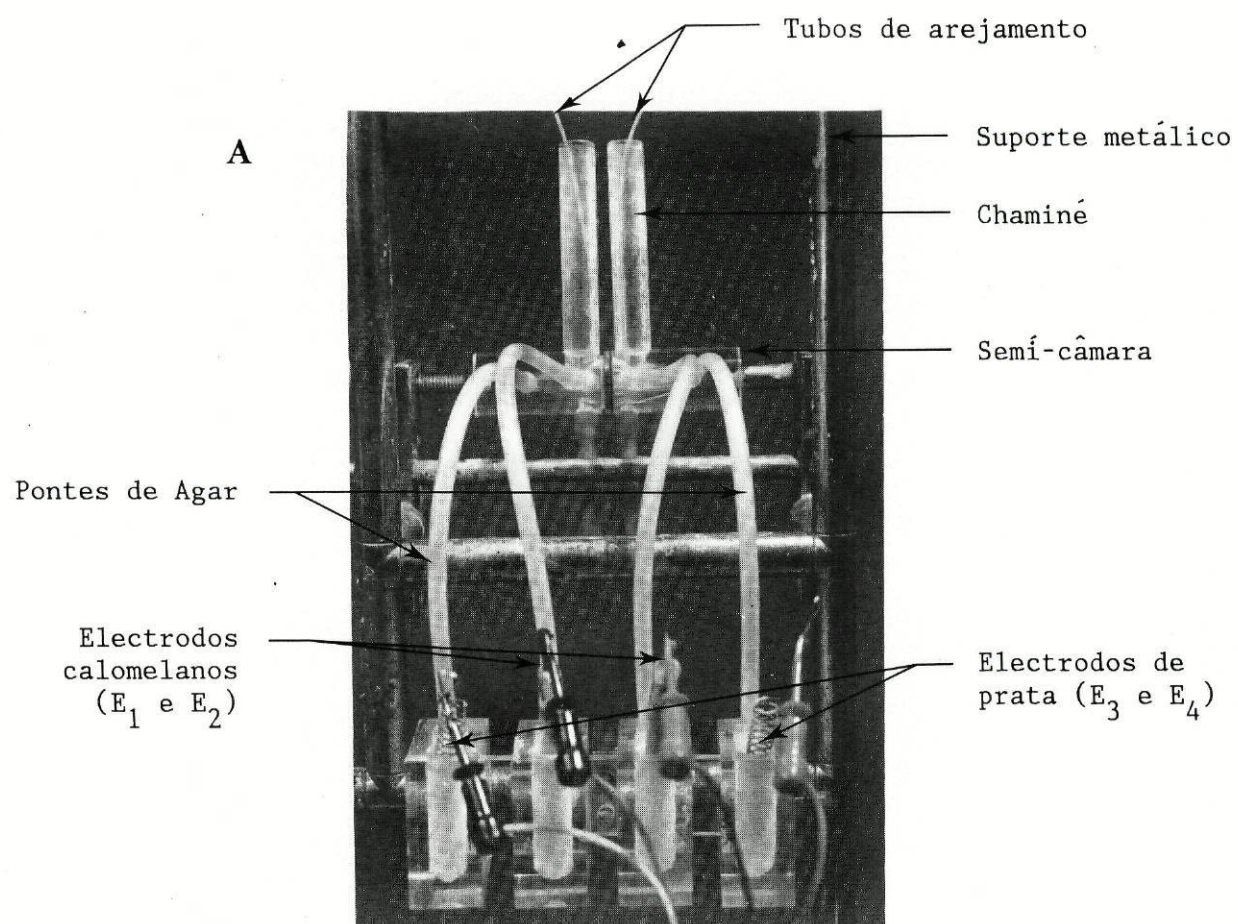


Fig. I.12 - Circuito equivalente de um epitélio (segundo Ussing). resistências membranares ( $R_a$  e  $R_b$ ); resistência da via paracelular ( $R_p$ ), potencial transmembranar ( $V_a$  e  $V_b$ ); potencial eléctrico transepitelial ( $V_e$ ).



Fig. I.13a.- Dispositivo utilizado na medição de correntes de curto-circuito (tipo Ussing) no epitélio extrapaleal do manto de *A. cygnea*. Semi-câmaras ( $C_1$  e  $C_2$ ) onde se introduzem as soluções (com  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  e tampão bicarbonato ou Tris) separadas pelo epitélio ( $C_1$  e  $C_2$ ); pontes de agar ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ ); eléctrodos calomelanos ( $E_1$  e  $E_2$ ) e de prata ( $E_3$  e  $E_4$ ) nas respectivas cuvets ( $Cv$ ) e com os cabos eléctricos a ligá-los ao sistema de curto-circuito; suporte metálico ( $S$ ).

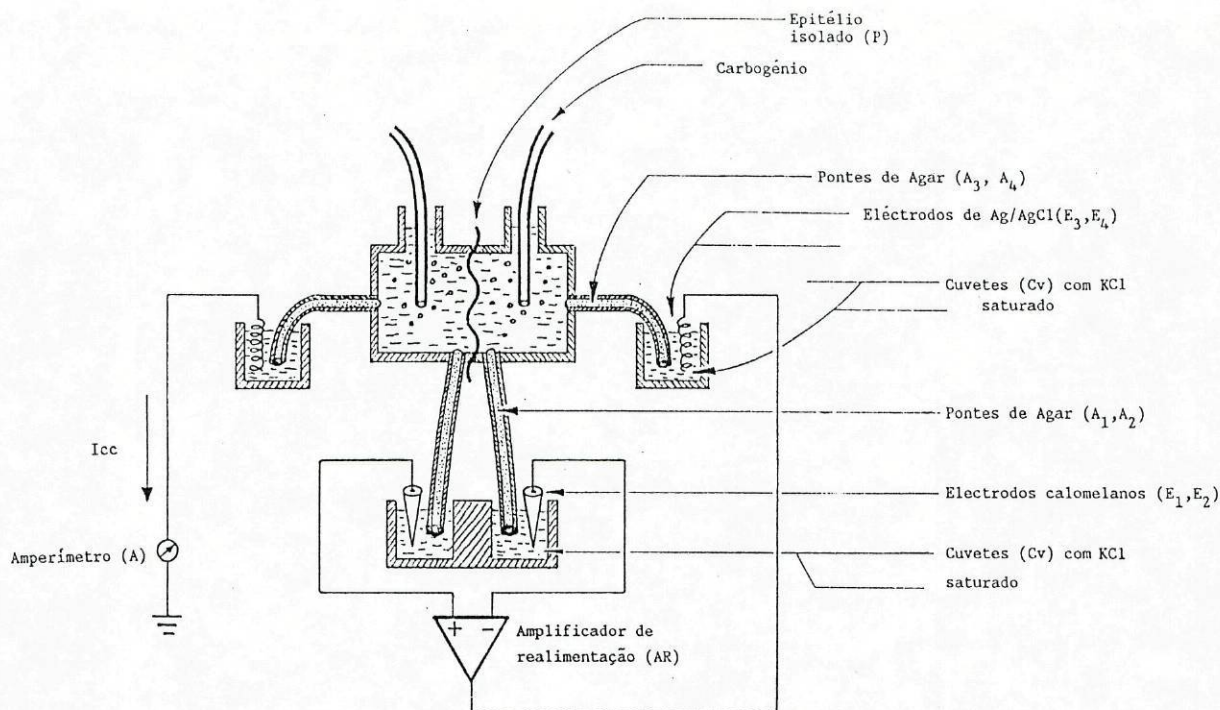
13b) Ampliação das semi-câmaras com as pontes e as chaminés (para introdução das soluções) e os tubos de escoamento ( $T_1$  e  $T_2$ ).





saturada contida em cuvetes (Cv). Estes eléctrodos, manufacturados a partir de uma mistura de mercúrio, calomelanos e KCl saturado em contacto com um fio de prata ou platina, estabelecem a continuidade eléctrica entre as pontes e o aparelho de medida (voltímetro). A utilização de uma solução saturada de KCl nas cuvetes reduz muito os potenciais de junção das pontes. Com efeito, dado que as mobilidades dos iões de potássio e dos iões cloro são semelhantes, potenciais difusionais devidos a outros iões proveniente das pontes tornam-se desprezíveis no interior das cuvetes (Ferreira e Marshall, 1985). Um outro par de pontes de Ringer-Agar ( $A_3$  e  $A_4$ ) estabelece contacto com as soluções de banho, o mais afastado possível da preparação. As extremidades exteriores das pontes contactam, através também da solução saturada de KCl nas cuvetes, com eléctrodos de fio de prata cloretado enrolados em espiral ( $E_3$  e  $E_4$ ). Em série e num sistema mais simples, haverá ainda uma bateria e um divisor potenciométrico que servem para injectar corrente no epitélio através dos eléctrodos de prata e um amperímetro (A) que mede a corrente injectada. Na prática, utiliza-se um sistema electrónico com injeção de corrente automática. Durante a operação a corrente injectada será tal que o potencial transepitelial cairá a um valor constante de zero (corrente de curto-circuito). Tudo se passará como se a corrente gerada pelo epitélio circulasse agora por um circuito externo de resistência zero. O circuito equivalente atrás descrito pode simplificar-se para assumir a forma representada na Figura I.14 em que,  $V_{ca}$  é o potencial transepitelial em circuito aberto (quando a corrente transepitelial injectada é zero),  $R_m$  é a resistência total da membrana e  $V_e$  o potencial transepitelial





13c) Diagrama do dispositivo acima descrito onde se pode ver ainda representado um amperímetro (A) para leitura da corrente de curto-circuito e um amplificador de realimentação ( $A_r$ ). As semi-câmaras  $C_1$ , e  $C_2$  contêm soluções com  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  e tampão bicarbonato ou TRIS.

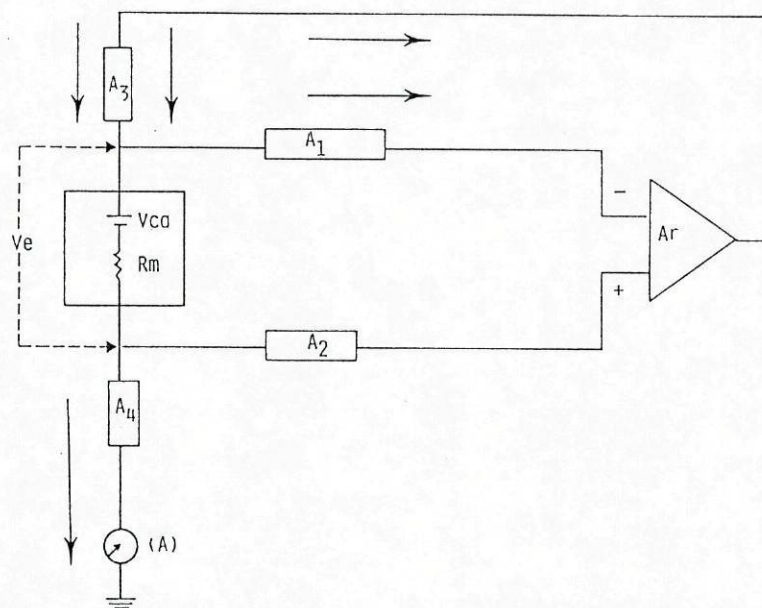


Fig. I.14 - Circuito equivalente do sistema representado na Fig. I.13c. Potencial transepitelial em circuito aberto ( $V_{ca}$ ); potencial transepitelial em circuito fechado ( $V_e$ ); corrente transmembranar ( $I_m$ ); resistência membrana ( $R_m$ ); pontes de agar ( $A_1$ - $A_2$ ); amperímetro (A); amplificador de realimentação ( $A_r$ ).



total já acima descrito. É fácil mostrar que:

$$R_m = \frac{R_p(R_a + R_b)}{R_a + R_b + R_p} \quad (11)$$

Então:

$$V_e = V_{ca} + I_m R_m \quad (12)$$

Quando  $V_e=0$  em curto-circuito, então:

$$I_c R_m = - V_{ca} \quad \text{ou seja} \quad I_m = - V_{ca}/R_m \quad (13)$$

isto é, a corrente lida (corrente de curto-circuito injectada) será tanto maior quanto maior é o potencial gerado pela preparação e quanto menor a resistência membrana. O curto-circuito pode ser obtido automaticamente por intermédio de sistemas electrónicos de realimentação ("feed-back") (Ferreira e Marshall, 1985).

Segundo Ussing (1960), a taxa de transporte de qualquer ião é tão baixa que dificilmente se demonstraria por métodos de análise química a relação exacta entre o transporte iónico e a corrente de curto-circuito. Ao contrário, o método dos radioisótopos permite determinar a taxa de transporte iónico com boa exactidão, sendo o transporte líquido de um ião a diferença entre os fluxos unidireccionais desse mesmo ião. A corrente de curto-circuito e o fluxo líquido para cada ião terão de ser expressos nas mesmas unidades (moles/cm<sup>2</sup>/s, por exemplo) para se poder estabelecer a relação entre a corrente injectada e os fluxos de carga devido aos movimentos iónicos o que nos permitirá saber qual ou quais iões estão envolvidos na génese do potencial transepitelial. Esta técnica de curto-circuito tem sido muito

usada para detectar transportes activos transmembranares dado que, se as soluções que banham em ambos os lados da preparação forem idênticas e a diferença de potencial eléctrico através do epitélio for zero não haverá forças motrizes externas. O movimento líquido de um dado ião terá de ser atribuído a um transporte "activo" desse mesmo ião (Cerejido e Rotunno, 1970). Este estudo pode ser complementado com inibidores específicos e metabólicos para confirmar se tanto a corrente como o fluxo líquido do respectivo ião são igualmente inibidos. A utilização de microelectrodos sensíveis ao potencial intracelular em conjunto com microelectrodos sensíveis às concentrações iónicas intracelulares complementam o estudo dos fluxos iónicos quer através da membrana apical quer da membrana basolateral. Alguns conhecimentos técnicos e métodos de cálculo relativos à aplicação deste equipamento vêm referidos no Capítulo III.

## 2.9-Determinação de fluxos iónicos

Como foi referido acima os métodos de medição de fluxos iónicos baseiam-se no uso de radioisótopos em condições estacionárias de "curto-circuito". Estes métodos pressupõem que os processos biológicos, químicos ou bioquímicos em geral não distinguem entre os vários isótopos do mesmo elemento tornando assim possível a marcação de um dado elemento pela simples adição num compartimento de uma pequena quantidade de um seu isótopo. Após a adição do isótopo espera-se o tempo necessário para que se faça uma distribuição homogénea do isótopo no compartimento e no interior das células. Elimina-se a primeira amostra colhida no compartimento oposto tendo que reencher com solução "fria" para se



dar início à experiência propriamente dita. Paralelamente deverá decorrer uma outra experiência idêntica mas em que se faz a marcação no lado oposto afim de se poder determinar o fluxo no sentido contrário. Depois de se efectuarem várias colheitas de amostras "frias" com tempos iguais lêem-se as actividades (desintegrações por minuto) das respectivas amostras "quentes" (solução onde se adiciona isótopo) e de alguns brancos para subtracção do ruído de fundo. Os cálculos a efectuar para a determinação dos fluxos iónicos em ambos os sentidos e para a determinação dos fluxos equivalentes a partir das respectivas correntes de curto-circuito serão indicados no Capítulo II.

## CAPÍTULO II

### ESTUDO ULTRAESTRUTURAL E CITOQUÍMICO DO MANTO

Os estudos mais relevantes sobre a ultraestrutura do manto de moluscos devem-se a Kawaguti e Ikemoto (1962) e a Istín e Masoni (1973). Estes autores descreveram a existência de microvilosidades na membrana apical e de mitocôndrias no pólo distal das células colunares do epitélio extrapaleal em *Fabulina nitidula*, *Margarita margaritifera* e *Anodonta grandis*. Mostraram também que no epitélio intrapaleal há células de forma achatada, predominantemente mucosas, ciliadas e com microvilosidades. Observaram ainda fibras de colagêneo, células conjuntivas e grânulos extracelulares calcificados no tecido interepitelial. Noutras espécies de moluscos, Yonge (1926), Takatsuki (1934), Nakahara (1962), Nakahara e Bevelander (1967) demonstraram a presença de amebócitos com a capacidade de ingestão de partículas das cavidades paleais do manto ou do tecido interepitelial e o seu posterior transporte.

Em estudos sobre o epitélio extrapaleal do manto de *A. cygnea*, Hotchkiss (1948), Steedman (1950), Pearse (1953) e Beedham (1958) concluíram que o muco segregado pelas células mucosas corresponde a uma mucoproteína ou um polissacarídeo neutro. Beedham (1958) verificou ainda que as células glandulares do epitélio intrapaleal do manto segregavam um mucopolissacarídeo ácido contendo grupos sulfatados.

Neste capítulo propomo-nos estudar características morfológi-



cas e ultraestruturais do manto de *A. cygnea* e muito principalmente identificar a natureza específica dos mucopolissacarídeos, segregados em ambos os epitélios e relacioná-los com alguns aspectos funcionais deste epitélio.

## 1-Materiais e Métodos

Fixaram-se pequenos fragmentos do manto de *A. cygnea*, após a sua dissecação, no líquido de Bouin e incluíram-se em parafina para microscopia óptica. Para o estudo topográfico do manto alguns cortes deste material foram corados com hemalúmen-eosina.

A identificação citoquímica dos polissacarídeos foi feita utilizando a reacção de Schiff em ácido periódico e a hidrólise enzimática do glicogénio pela amilase salivar. Para a identificação dos mucopolissacarídeos ácidos com grupos sulfatados, usaram-se as colorações de azul alcian, a pH 2.6 (Wagner e Shapiro, 1957) e variantes a pH 1.0 (Lev e Spiecer, 1964). A coexistência de mucopolissacarídeos ácidos e neutros na mesma célula foi observada através das reacções combinadas de azul alcian e Schiff em ácido periódico (Vialli, 1953). A caracterização da natureza específica dos grupos sulfidril foi conseguida pela reacção da fucsina-paraldeído a seguir à pré-oxidação pelo ácido perfórmico (Toennies and Homiller, 1942). Esta técnica, juntamente com o tricrómio de Masson e a digestão enzimática pela tripsina, durante 3 horas (Lillie, 1965) permitiram a identificação das fibras elásticas.

Para um estudo em microscopia electrónica de transmissão, fixaram-se fragmentos do manto durante 2h a 4°C em glutaraldeído



a 2.5%, tamponado a pH 7.2 com cacodilato 0.2M, sendo posteriormente lavados com tampão cacodilato 0.2M (durante a noite). Os fragmentos foram pós-fixados durante 2h, em tetróxido de ósmio a 2.0%, dissolvido no mesmo tampão. Todos os fragmentos foram desidratados numa série gradual de etanol e embebidos em epon. Os cortes semi-finos para microscopia óptica corados com azul de metileno azur II, serviram para localizar os dois epitélios. Observaram-se os cortes ultra-finos, duplamente contrastados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, num microscópio electrónico Siemens Elmiskop IA operando a 80 Kv. Realizaram-se estudos citoquímicos com cortes ultrafinos em grêlhas de ouro, submetendo-os ao teste de Thiéry por períodos de 3h e 72h (Thiéry 1967).

Para estudos morfológicos os fragmentos do manto, após serem igualmente fixados, desidratados e secos ao ar, foram colocados sobre suportes de zinco com prata condutora e cobertos com uma camada de ouro de cerca de 100 nm. As observações destes fragmentos foram feitas num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-35C a 25 Kv. A identificação das grânulos de carbonato de cálcio foi obtida por microanálise de energia dispersiva.

Películas de matriz orgânica, extraídas da face interna da concha, foram submetidas a uma análise por difracção de raio-X, assim como um padrão de quitina existente na pluma córnea da lula *Loligo*. Utilizou-se a técnica do filme plano com um gerador Philips PW 1030 de radiação de  $\text{CuK}\alpha$ , a 40 Kv e 20 mA. Aplicou-se perpendicularmente um feixe monocromático através da amostra durante um período de 7-8 hr.



## 2-Resultados

### 2.1-Observações morfológicas

#### 2.1.1-Epitélio extrapaleal

O estudo morfológico na região central do manto de *A. cygnea* foi feito com a técnica topográfica de hemalúmen-eosina. Verificou-se a existência dum epitélio extrapaleal constituído por células colunares, com 25 a 30  $\mu\text{m}$  de altura e 6 a 8  $\mu\text{m}$  de largura, e núcleos ovóides localizados na região apical (Fig. II.1). Foi possível identificar a presença de dois tipos de células que designaremos por A e B (Fig. II.1). O tipo A é predominante e tem o núcleo positivo ao hemalúmen e o citoplasma positivo à eosina. O tipo B é constituído por células secretoras com o núcleo positivo ao hemalúmen e o produto de secreção negativo à eosina.

Nas células A foi possível observar microvilosidades dispostas paralelamente no pólo apical, com 2.5  $\mu\text{m}$  de comprimento máximo e de cerca de 0.1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e demossomas na parte superior da membrana lateral (Figs II.9, II.9a e II.12a). No citoplasma especialmente na região distal, há a destacar a presença de mitocôndrias, de retículo endoplasmático rugoso com perfil vesicular com cerca 0.3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de vesículas lisas com 0.2  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio, de microtúbulos e microfilamentos sem qualquer orientação preferencial e de vesículas com cerca de 0.7  $\mu\text{m}$  de diâmetro apresentando textura granular e/ou corpos opacos aos electrões (Figs II.10-12). As células B apresentam também microvilosidades na membrana apical e um produto de secreção volumoso, exibindo um aspecto floculento em forma de pêra (Figs II.1, II.9 e II.13). Este muco é constituído por grânulos de secreção não opacos aos electrões (Figs II.9 e II.13)

Fig. II.1 - Epitélio extrapaleal do manto de *A. cygnea* corado com hemalúmen-eosina e observado ao microscópio óptico. Núcleo (Nu); Célula A não secretora (A); Célula B secretora (B); Fibras elásticas (\*). x625.

Fig. II.2 - Epitélio intrapaleal do manto de *A. cygnea* corado com hemalúmen-eosina e observado ao microscópio óptico. Núcleo (Nu); Célula C não secretora (C); Célula D secretora (D); Célula D secretora jovem (cabeças de setas). x625.

Fig. II.3 - Fibras elásticas (\*) coradas pela técnica de tricrómio de Masson. x625.

Fig. II.4 - Epitélio extrapaleal corado pelo reagente Schiff. Célula A com glicogénio (Gl) e célula B com produto de secreção positivo (\*). x625.

Fig. II.4a - Hidrólise enzimática pela amilase salivar. Célula A com o glicogénio digerido; O produto de secreção não está digerido na célula B (\*). x625.

Fig. II.5 - Epitélio intrapaleal corado pelo reagente Schiff. Células C e D com glicogénio (Gl) na região apical; Células C (setas). Células D com produto de secreção positivo (\*); Células D jovens com grandes áreas fracamente positivas (cabeças de setas). x625.

Fig. II.5a - Hidrólise enzimática pela amilase salivar. O glicogénio digerido nas células C e D; Células D com o produto de secreção positivo ao reagente Schiff (\*); Células D jovens (cabeças de setas). x625.

Fig. II.6 - Epitélio intrapaleal corado pelo azul de alcian (pH 2.6). Células C (setas); Células D com o produto de secreção muito positivo (\*); Células D jovens (cabeças de setas). x625.

Fig. II.6a - Epitélio intrapaleal corado pelo azul de alcian (pH 1.0). Células D com o produto de secreção positivo (\*); Célula D jovem (cabeças de setas). x625.

Fig. II.7 - Epitélio intrapaleal corado pelo azul de alcian+Schiff mostrando células com glicogénio na região apical. Células C (setas); Células D1 (azul) com produtos de secreção positivo ao azul de alcian; Células D2 (violeta) com produto de secreção positivo ao azul de alcian+Schiff. x625.

Fig. II.8 - Epitélio intrapaleal corado pela fucsina-paraldeído depois de oxidado pelo ácido perfórmico. Células D mostrando o produto de secreção com reacção positiva (\*). Células D jovens (cabeças de setas). x625.

Fig. II.8a - Epitélio extrapaleal com reacção negativa à coloração pela fucsina-paraldeído (setas). Fibras elásticas coradas positivamente (\*). x625.



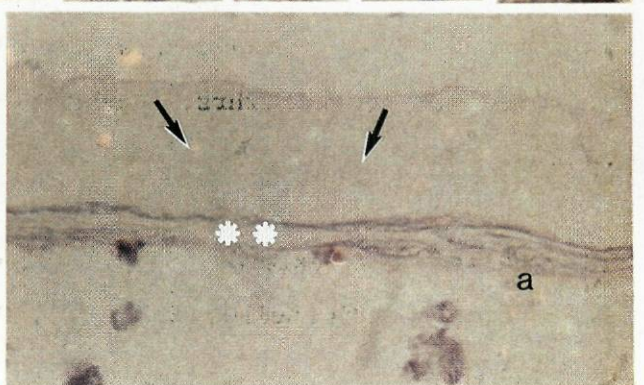
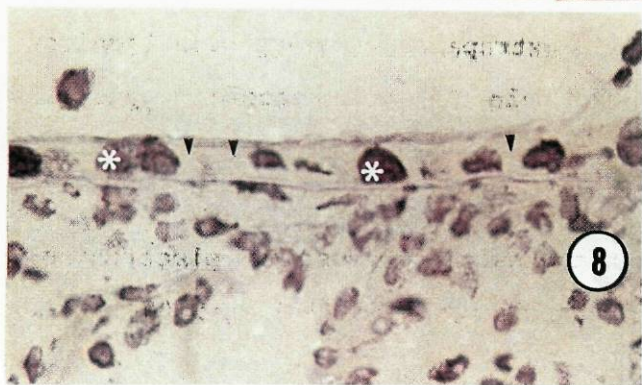
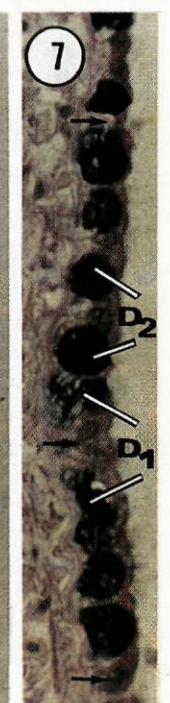
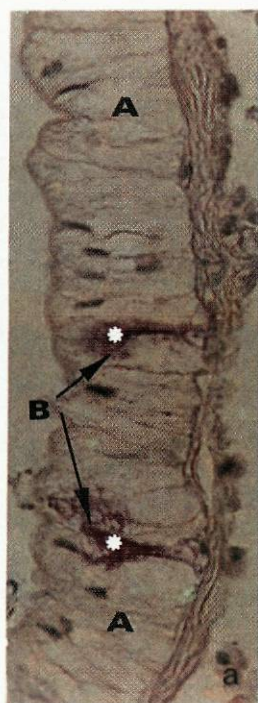
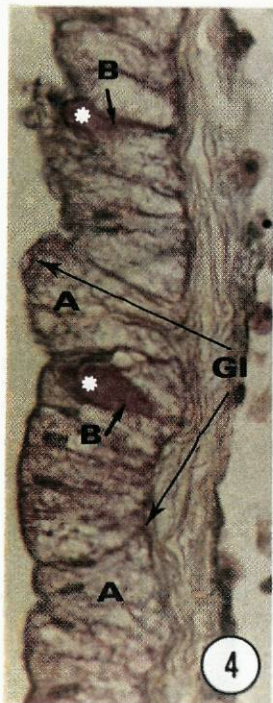
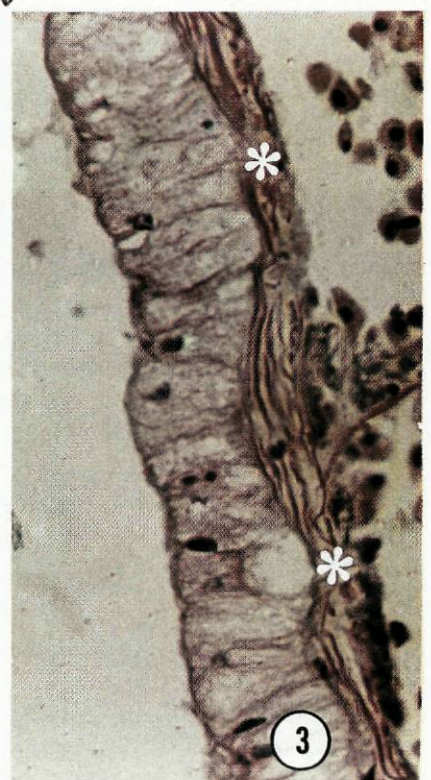
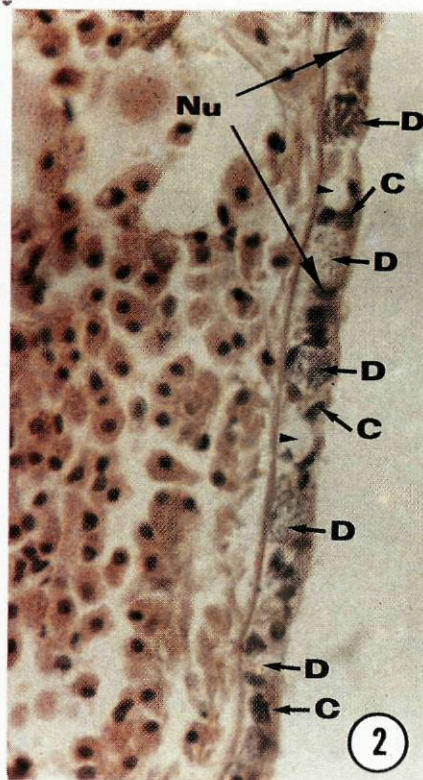
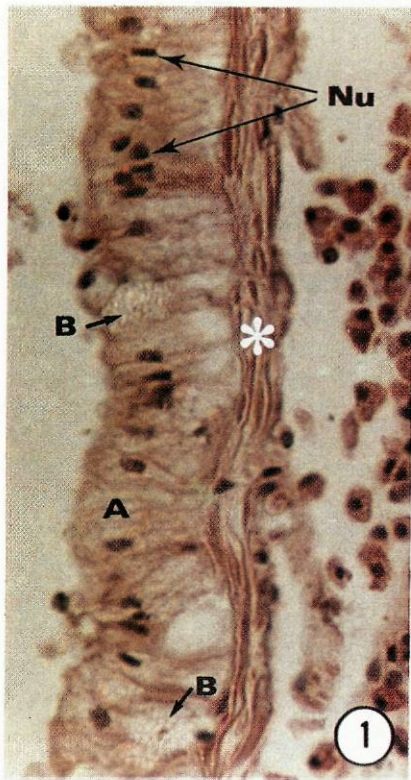




Fig. II.9 - Epitélio extrapaleal com os dois tipos de células ao microscópio electrónico de transmissão. Célula A não secretora (A); Célula B secretora (B); Fibras elásticas na base do epitélio (\*); Microvilosidades (Mv). x3.000.

Fig. II.9a - Corte longitudinal das microvilosidades (Mv); Glicocálix (Gl). x20.000.

Fig. II.10 - Região apical duma célula A, não secretora, do epitélio extrapaleal. Mitocôndria (Mi); Microfilamentos (Mf); Ribosomas (Ri). x28.000.

Fig. II.11 - Célula A, não secretora, do epitélio extrapaleal. Vesículas do R.E.R (\*); Vesículas citoplasmáticas lisas (Vc); vesícula de textura granular (setas); Glicogénio (Gl). x15.000.

Fig. II.11a - Célula A, não secretora, do epitélio extrapaleal tratada pela técnica selectiva de Thiéry-3hrs. Os depósitos escuros são grãos de glicogénio (setas). x12.000.

Fig. II.12 - Célula A, não secretora, do epitélio extrapaleal. Microvilosidade (Mv); Microfilamentos (Mf); Microtúbulos (Mt); Mitocôndrias (Mi); Ribosomas (Ri); Corpo opaco aos electrões(\*); vesícula de textura granular e com um corpo opaco (setas); Desmosomas (De). x18.000.

Fig. II.12a - Corte ultrafino do epitélio extrapaleal. Desmosoma (setas). x40.000.

Fig. II.13 - Célula B secretora do epitélio extrapaleal tratada pela técnica selectiva de Thiéry-72hrs. Produto de secreção (\*) com reacção negativa. x6.000.

Fig. II.14 - Face externa do epitélio extrapaleal ao microscópio electrónico de varrimento. Microvilosidades (\*); Produto de secreção (\*\*). x12.000.



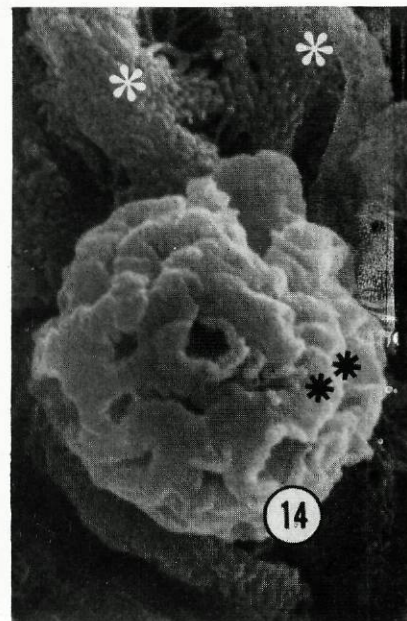
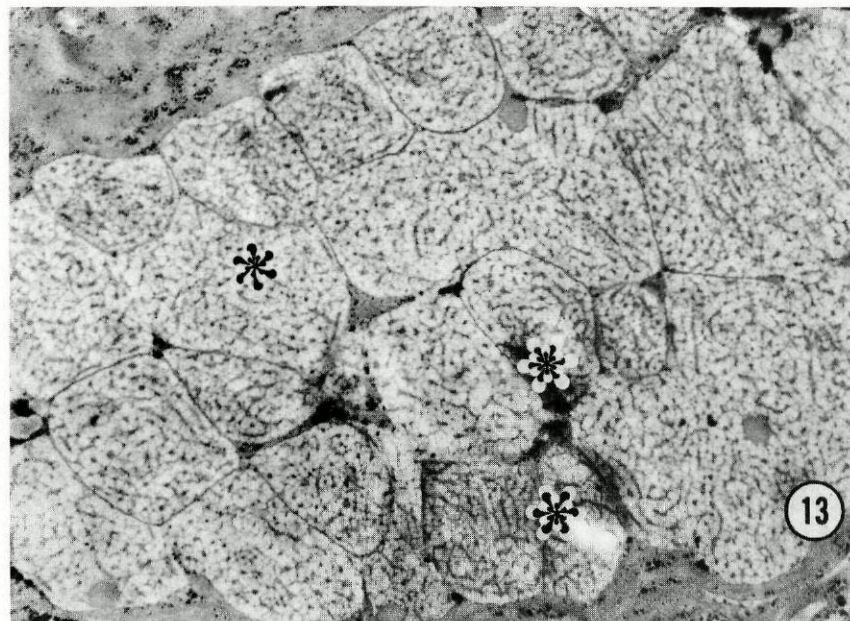
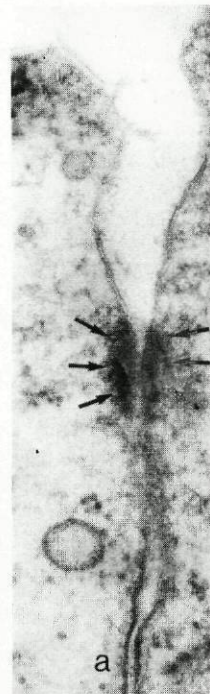
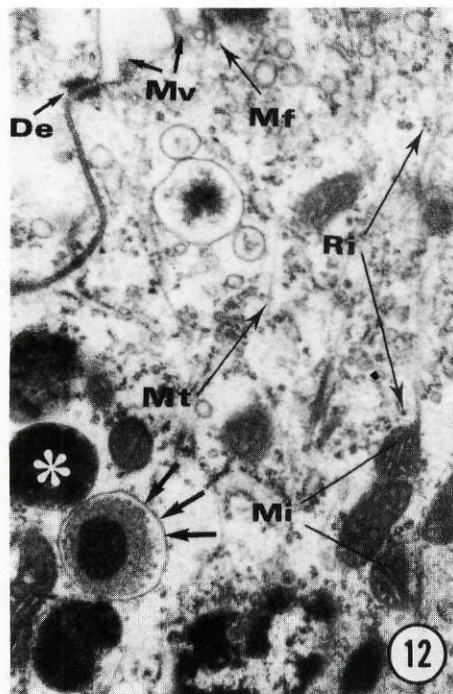
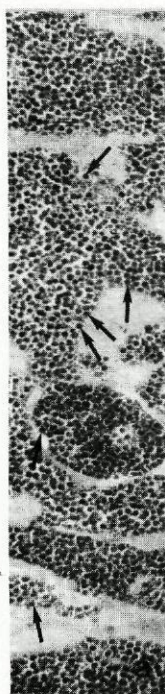
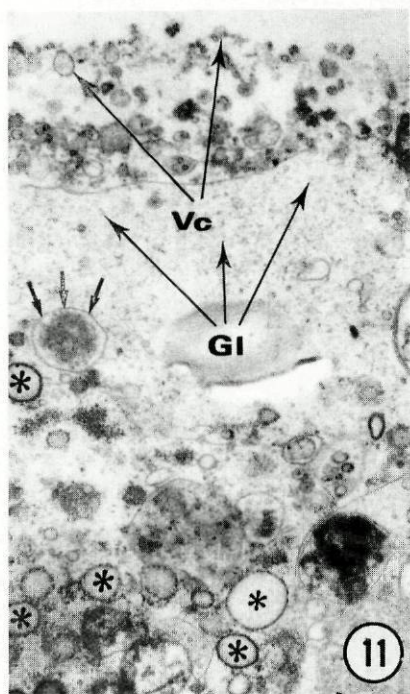
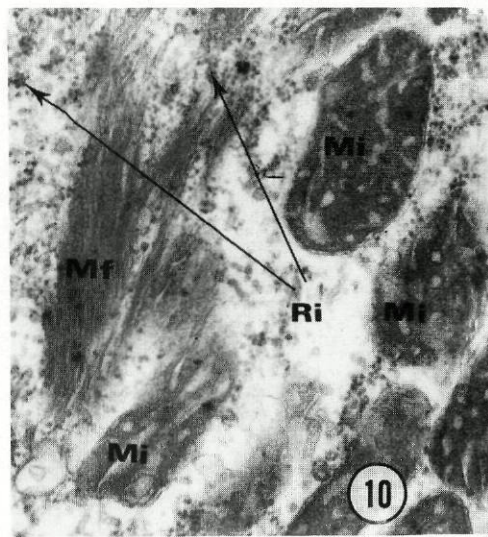
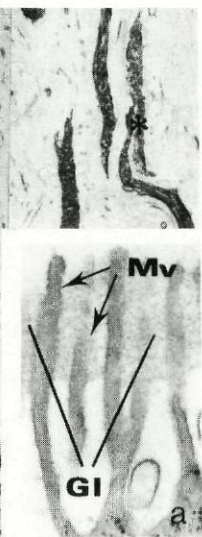
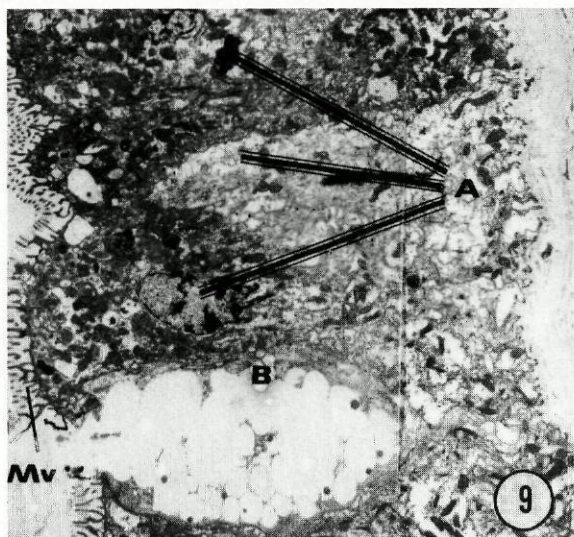




Fig. II.15 - Face externa do epitélio intrapaleal. Cílios (Cl); Microvilosidades (Mv); Células de forma hexagonal (\*). x8.250.

Fig. II.16 - Epitélio intrapaleal do manto ao microscópio electrónico de transmissão. Núcleo (Nu); Cílios (Cl); Microvilosidades (Mv); Célula C (setas); Célula D com uma grande massa de secreção (\*). x2.700.

Fig. II.16a - Epitélio intrapaleal do manto com um amebócito na base. Célula C (setas); Célula D (\*); Amebócito (A). x2.700.

Fig. II.17 - Face externa do epitélio intrapaleal ao microscópio electrónico de varrimento. Cílios (Cl); Microvilosidades (Mv); Produto de secreção (\*). x24.000.

Fig. II.18 - Zona basal do epitélio extrapaleal ao microscópio electrónico de transmissão. Fibras elásticas (\*); Glicogénio (Gl); Mitocôndria (Mi); Grânulos de carbonato de cálcio (setas). x7.500.

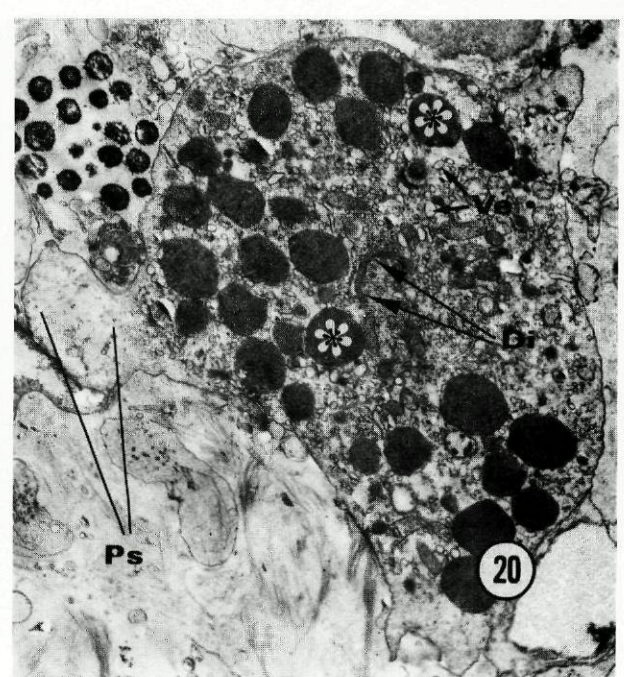
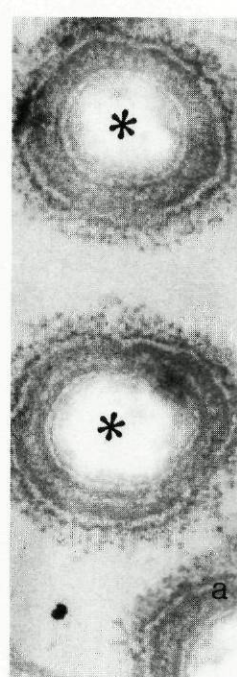
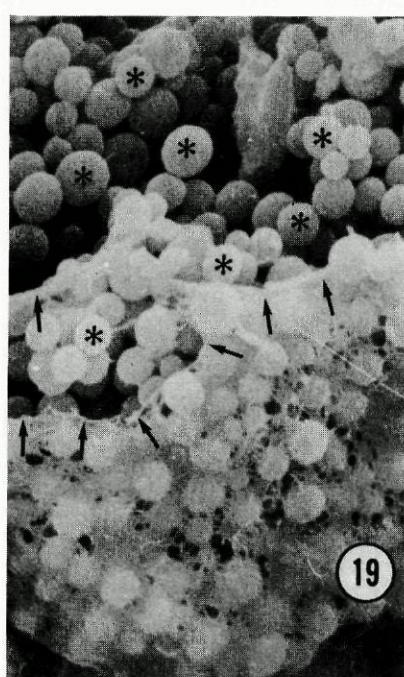
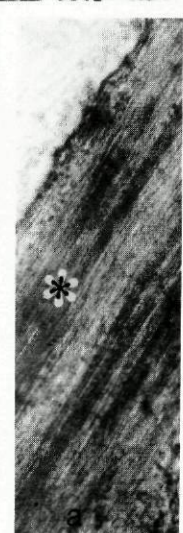
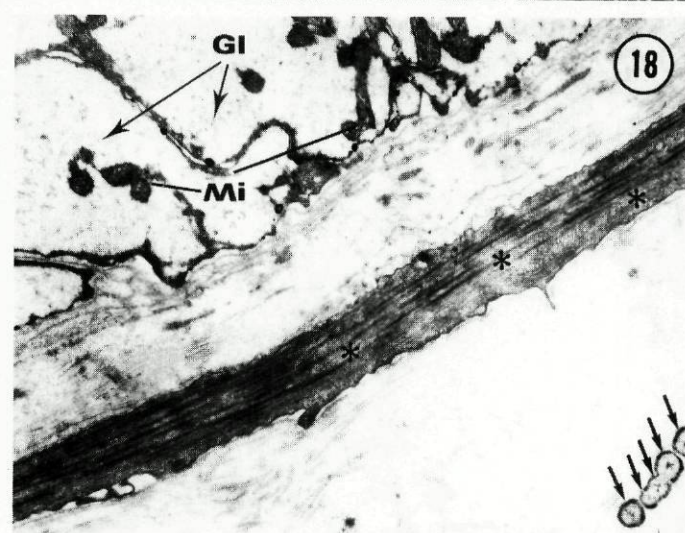
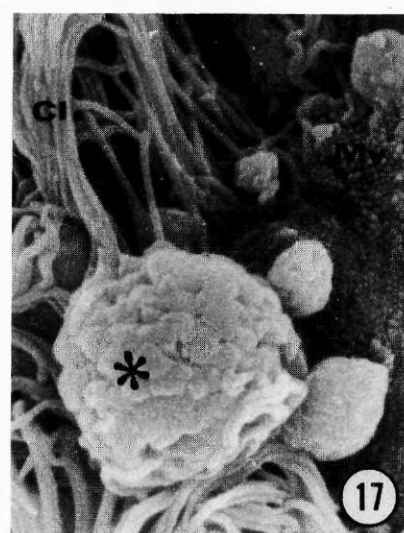
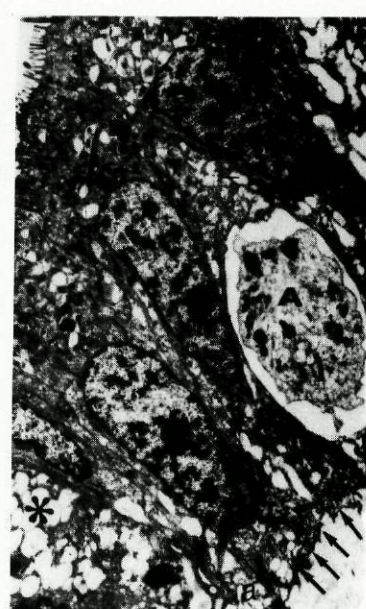
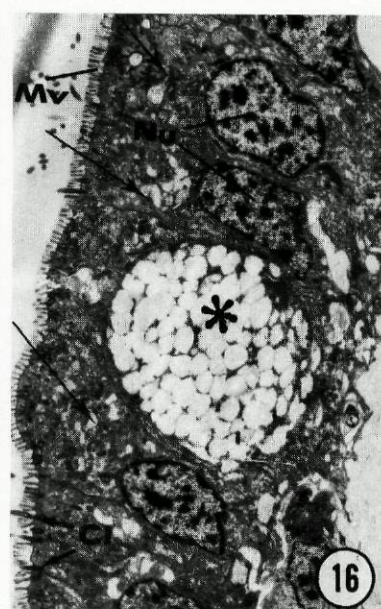
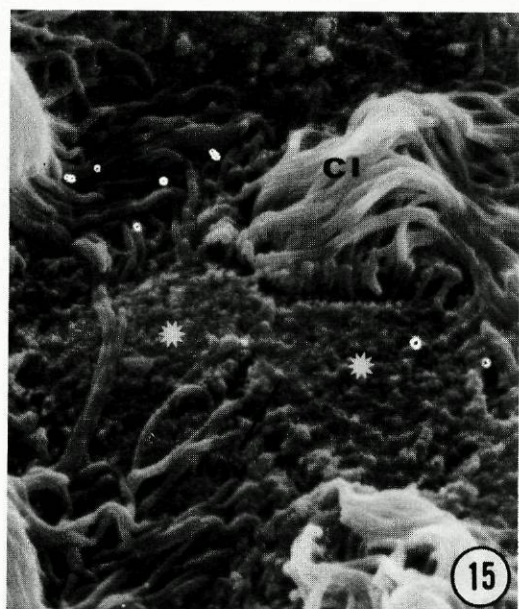
Fig. II.18a - Imagem ampliada duma fibra elástica mostrando microfibrilas sem estrias (\*). x40.000.

Fig. II.19 - Tecido interepitelial ao microscópio electrónico de varrimento. Grânulos de cálcio (\*) envolvidos por uma rede fibrosa (setas). x24.000.

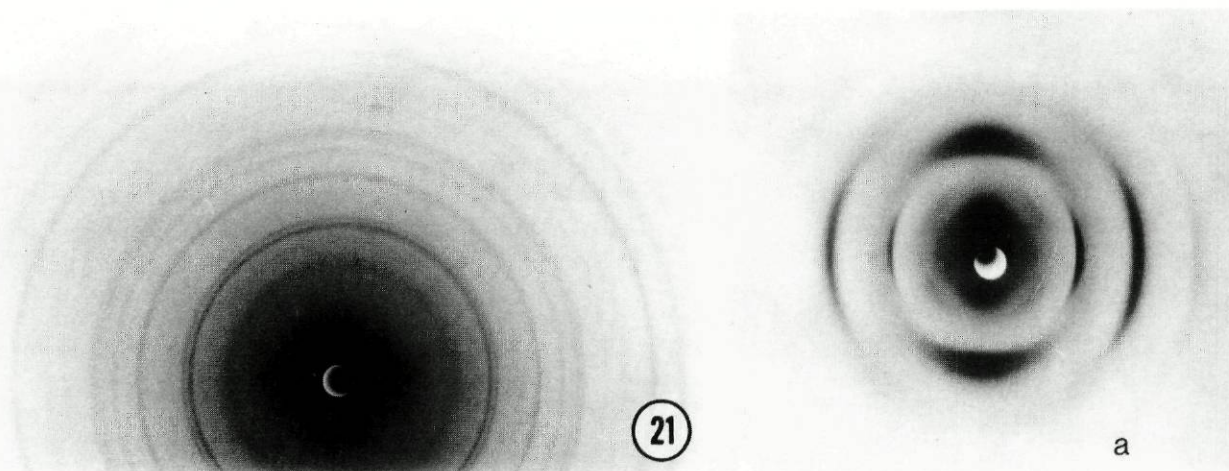
Fig. II.19a - Grânulos de cálcio seccionadas, sem o duplo contraste pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo, mostrando em microscopia electrónica de transmissão várias lamelas concêntricas (\*). x30.000.

Fig. II.20 - Amoebócito no tecido interepitelial. Corpos opacos aos electrões (\*); Dictiosomas (Di); Numerosas vesículas (Ve); Pseudópode (Ps). x6.000.









**Fig. II.21** - Difracção de raio-X através da película de matriz orgânica de *A. cygnea* pela técnica de filme plano. Banda de reflexão da quitina com 4.1-4.9 Å.

**Fig. II.21a** - Difração de raio-X através do pluma córnea da lula (*Loligo*) pela técnica de filme plano. Reflexão do padrão de quitina com 4.6 Å.



sendo possível observá-lo em fase de expulsão para o compartimento extrapaleal (Fig. II.14).

### 2.1.2-Epitélio intrapaleal

Com a técnica topográfica de hemalúmen-eosina encontraram-se também neste epitélio dois tipos de células que designamos por C e D (Fig. II.2). Em ambos os tipos de células o citoplasma e o núcleo reagiram positivamente à eosina e ao hemalúmen respectivamente. Este epitélio é formado principalmente por células achatadas D, com 10 a 13  $\mu\text{m}$  de altura e 10 a 15  $\mu\text{m}$  de largura (Fig. II.2). Nestas células a maior parte do volume é ocupado pelo produto de secreção restando um citoplasma reduzido com o núcleo parietal (Fig. II.2). As células C são mais estreitas apresentando uma forma colunar com 10 a 13  $\mu\text{m}$  de altura e 4 a 6  $\mu\text{m}$  de largura (Fig. II.2).

As observações ao microscópio electrónico mostraram, no pólo apical das diferentes células, longos cílios de 9 a 11  $\mu\text{m}$  de comprimento e pequenas microvilosidades de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figs II.15-17). O muco libertado pelas células D (Fig. II.17) consiste numa massa formada por grânulos concentrados não opacos aos electrões (Fig. II.16). Foram ainda observadas células C de formas colunares, sem grãos de secreção ou apenas com alguns grânulos dispersos e distribuídas por entre as células D (Fig. II.16).

### 2.1.3-Tecido interepitelial

As microfotografias mostram a existência de fibras com 1.3  $\mu\text{m}$  de espessura, sobretudo na base do epitélio extrapaleal, constituídas por microfibrilas sem estrias (Figs II.1, II.3, II.9, II.18 e II.18a). Os estudos citoquímicos mostram que estas fibras têm forte afinidade para a eritrosina (tricroímio de Masson) (Fig. II.3) e para a fucsina-paraldeído (Fig. II.8a), são fracamente positivos ao reagente Schiff e facilmente digeridos pela reacção enzimática da tripsina. As fibras que envolvem os grupos de grânulos de cálcio (Fig. II.19) como uma rede, parecem apresentar as mesmas características estruturais e citoquímicas.

A identificação de carbonato de cálcio nos grânulos foi feita pela microanálise de energia dispersiva. A observação de cortes ultrafinos mostrou que estes grânulos calcários são constituídos por lamelas concêntricas.

Neste tecido existem algumas células volumosas de formas variáveis, com a capacidade de emitirem pseudópodes, e que se localizam sobretudo na base do epitélio intrapaleal (Fig.II.16a). É de realçar a presença no citoplasma de muitos grânulos eosinófilos e opacos aos electrões com 0.8-1.3  $\mu\text{m}$  de diâmetro podendo ainda identificar-se um dictiosoma e um grande número de pequenas vesículas dispersas com o diâmetro médio de 0.2  $\mu\text{m}$  (Fig. II.20).

### 2.2-Observações citoquímicas

Fez-se o estudo citoquímico das diferentes células (A, B, C e D) e elaborou-se um quadro (Tabela II.1) de resultados a partir da utilização de diferentes técnicas citoquímicas nos dois epitélios (Figs II.4-8) que permitiram a identificação dos vários



produtos de secreção celular.

O citoplasma apresenta reacção positiva ao reagente Schiff em todas as células que desaparece quando a digestão enzimática pela amilase é previamente aplicada.

Algumas células do epitélio intrapaleal têm grandes áreas do citoplasma com coloração negativa ou fracamente positiva a qualquer reacção citoquímica.

A técnica de Thiéry revelou resultados positivos para as células A do epitélio extrapaleal depois de 3hrs e negativos para os produtos de secreção das células B depois de 72hrs (Fig. II.11 e II.13).

TABELA II.1. Características citoquímicas do muco segregado pelos epitélios extra e intrapaleal.

EPITÉ- LIOS	CÉLULA	MÉTODOS						
		Azul a. pH 2.6	Azul a. pH 1.0	SAP	Amilase + SAP	Azul a. + SAP	Azul a.+ Amil+SAP	FPA Pre-oxid.
EXTRA	A	-	-	+	- SAP	- Azul + SAP	- Azul - SAP	-
	B	-	-	++	++ SAP	- Azul ++ SAP	- Azul ++ SAP	-
INTRA	C	-	-	±	± SAP	- Azul ± SAP	- Azul ± SAP	±
	D <sub>1</sub>	++	++	++	++ SAP	++ Azul - SAP	++ Azul - SAP	++
	D <sub>2</sub>	+	+	+	+ SAP	+ Azul violeta + SAP	+ Azul violeta + SAP	+

SAP = reacção pelo Schiff em ácido periódico  
FPA = reacção pela fucsina-paraldeído

### 2.3-Análise pelo raio X

A difracção de raio X através da película de matriz orgânica, extraída da face interna da concha, mostrou as seguintes reflexões contínuas: 3.3; 3.4; 4.1-4.9; 5.3 e 7.4 Å (Fig. II.21).

Para control utilizou-se a quitina da pluma córnea de *Loligo* cujas reflexões são: 11.3 e 4.6 Å (Fig. II.21a).

### 3-Discussão

#### 3.1-Epitélio extrapaleal

Os estudos ultraestruturais por nós realizados permitem destacar nas células A, em comparação com observações anteriormente realizadas (Kado, 1953; Beedham, 1958; Istín e Masoni, 1973), a presença de desmosomas, de inúmeras pequenas vesículas citoplasmáticas envolvidas provavelmente nos mecanismos de formação da concha e de glicogénio por todo o citoplasma, principalmente junto à membrana citoplasmática. A existência de vesículas maiores com diferentes graus de opacidade aos electrões sugere um processo evolutivo desde uma textura granular até uma textura opaca.

Hotchkiss (1948), Steedman (1950) e Pearse (1953) sugeriram que as células B segregavam uma mucoproteína ou um polissacarídeo. As nossas observações mostram claramente que se trata de quitina, mucopolissacarídeo neutro com uma função estrutural, já mencionada por Beedham (1954). Esta opinião baseada na positividade ao reagente Schiff mesmo na presença prévia da amilase (Gabe, 1968; Ganter e Jolles, 1969) e na negatividade ao azul alcian (Wagner e Shapiro, 1957) é apoiada pela reacção negativa à técnica de Thiéry. Estas observações são claramente reforçadas com a difracção de raio X pela matriz orgânica da concha, visto ser possível identificar, em particular, a banda de reflexão da quitina (4.1-4.9 Å). Esta banda de reflexão está de acordo com a reflexão da quitina (4.6 Å) da pluma córnea da lula *Loligo*,



referido por Rudall (1963) e usada aqui como padrão. Segundo Rudal (1963), a existência normal desta banda pouco definida deve-se à frequente associação da quitina com outro composto, provavelmente uma proteína.

Estes dados sugerem que as células mucosas B excretam material quitinoso o qual forma a matriz orgânica, contribuindo deste modo para o crescimento da concha em espessura. Esta sugestão está de acordo com Kobayashi (1962), Wilbur (1964) e Wilbur e Saleuddin (1983) dado terem admitido que o epitélio extrapaleal está envolvido na secreção da matriz orgânica.

### 3.2-Epitélio intrapaleal

Beedham (1958) verificou que as células mucosas deste epitélio segregam mucopolissacarídeos ácidos com grupos sulfatados. As nossas observações (Tabela II.1) revelaram ainda a existência de pelo menos dois tipos de células mucosas (D1 e D2) com grânulos de secreção não opacos aos electrões, concentrados numa grande massa mucosa. As células D1 segregam apenas mucopolissacarídeos (fracamente ácidos) com grupos sulfatados, de acordo com a coloração azul da reacção combinada (Vialli, 1953), com o azul turquesa (Lev e Spiecer, 1964) e com a forte afinidade para o azul alcian, o reagente Schiff e a fucsina-paraldeído (Gabe, 1968). As células D2 segregam uma associação de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados com um mucopolissacarídeo neutro de acordo com a coloração violeta da reacção combinada (Vialli, 1953) e também com o azul turquesa e a forte positividade ao azul de alcian (Lev e Spiecer, 1964; Gabe, 1968).

A pré-oxidação das secreções das células D pelo ácido

perfórmico e posterior coloração pela fucsina-paraldeído (Toennies e Homiller, 1942) mostra que há também uma associação com grupos sulfidril, provavelmente cisteína, formando proteoglicanos (Fransson, 1987).

Se tivermos em mente as funções do muco branquial nos lamelibrânquios (Grassé et al., 1970) e as funções digestivas do manto primitivo no gloquídio de *A. cygnea* (Dawydoff, 1928) parece lógico admitir que estes mucopolissacarídeos possam realizar funções relacionadas com a actividade digestiva do animal. Dado que estas substâncias mucosas provêm dum epitélio que está directamente em contacto com a água do meio externo, poder-se-à ainda atribuir a estas secreções funções de impermeabilização que contribuem para a regulação da pressão osmótica da hemolinfa.

Pensamos que as células C correspondem a células indeferenciadas que podem eventualmente transformar-se em precursores das células D1 ou D2 substituindo-as quando já envelhecidas. Esta sugestão baseia-se no facto de as células C se apresentarem nalguns casos totalmente desprovidas de secreção e noutros evidenciarem já alguns grânulos mas ainda dispersos no citoplasma e sem alteração da forma colunar típica.

No que se refere às células que possuem grandes áreas com coloração negativa ou muito fracamente positiva a qualquer reacção citoquímica, admitimos que possam corresponder a células mucosas muito jovens.



### 3.3-Tecido interepitelial

Os nossos resultados mostram principalmente a presença de fibras elásticas devido à afinidade para a eritrosina revelada pela coloração com o tricrómio de Masson e à fácil digestão pela tripsina (Lillie, 1965). A coloração pela fucsina-paraldeído depois da oxidação com o ácido perfórmico, revela a presença de grupos sulfidril, muito provavelmente cistina, que são típicos das fibras elásticas (Bloom e Fawcett, 1975). A ausência de estrias, característica das fibras de colagénio, nas microfotografias que ilustram este trabalho, reforçam os dados citoquímicos em que se baseia a nossa conclusão. Estas observações estão em desacordo com os estudos de Istín e Masoni (1973) que consideraram a existência de fibras de colagénio no tecido interepitelial.

Foram já descritos amebócitos noutros moluscos por Young (1926), Takatsuki (1934), Nakahara (1962) e Nakahara e Bevelander (1967) e referidos em *Anodonta* por Beedham (1958) e Manigault (1960) com as funções mais variadas. Em *A. cygnea* encontramos também células semelhantes aos amebócitos. Esta semelhança resulta da presença de grânulos muito eosinófilos e opacos aos electrões tratando-se possivelmente dos lisosomas referidos por Nakahara e Bevelander (1967). A observação de numerosas vesículas pequenas no citoplasma, relacionadas provavelmente com uma forte actividade endocítica, e a existência de pseudopodes são ainda características a favor duma actividade fagocitária.

Este capítulo realça, em particular, a natureza específica das diferentes secreções e estabelece uma possível correlação com os aspectos funcionais dos dois epitélios.

#### 4-Sumário

4.1 - No epitélio extrapaleal observaram-se dois grupos de células colunares. Um grupo segrega quitina, mucopolissacarídeo neutro, que participa na formação da concha. Um outro grupo, mais numeroso, contem um grande número de pequenas vesículas citoplasmáticas na região apical.

4.2 - No epitélio intrapaleal encontraram-se três tipos diferentes de células mucosas. Um tipo segrega mucopolissacarídeos pouco ácidos com grupos sulfatados e o outro tipo segrega uma associação destes com um mucopolissacarídeo neutro. A presença de grupos sulfidril indica a existência de proteoglicanos nestas secreções. Foi possível caracterizar um terceiro tipo de células com uma morfologia muito diferente. Talvez correspondam a células indiferenciadas podendo originar qualquer um destes dois tipos acima descritos.

4.3 - No tecido interepitelial identificaram-se amebócitos e fibras elásticas na base do epitélio extrapaleal.



### CAPÍTULO III

#### ELECTROFISIOLOGIA DO EPITÉLIO EXTRAPALEAL

O manto dos lamelibrânquios é um folheto que cobre a superfície interna da concha. É constituído (Istin e Kirschner, 1968; Neff, 1972) por dois epitélios, o interno ou intrapaleal que envolve o corpo do animal e está em contacto com o meio externo e o epitélio externo ou extrapaleal que está em contacto com a concha, separado apenas por uma fina camada de líquido, o líquido extrapaleal. Os dois epitélios estão ligados pelo tecido conjuntivo que contem a hemolinfa (compartimento sanguíneo) e estendem-se até ao bordo do manto onde esta estrutura adere à zona mais periférica da concha. A concha cresce em área na zona periférica e em espessura na restante superfície interna (Wilbur, 1982).

Devido à sua natureza, a concha não permite quaisquer trocas entre o líquido extrapaleal e o meio externo. Os componentes inorgânicos e orgânicos da concha são segregados pelo manto para o líquido extrapaleal. Wilbur (1972) mostrou que as células do epitélio extrapaleal do manto (EEM) segregam as proteínas da matriz e estudos com o manto isolado-concha em *Crassostrea virginica* revelaram que a formação da concha pode ocorrer sem a participação dos sistemas digestivo e circulatório (Hirata, 1953; Jodrey, 1953). Estas observações juntamente com a proximidade estreita entre o manto e a concha sugerem que, pelo menos nos bivalves marinhos, o manto está também envolvido no fornecimento dos componentes minerais da concha.

O manto é permeável ao cálcio (Istin e Metz, 1964; Kirschner e Sorenson, 1964). Istin e Metz (1964) referiram que, em experiências de dupla marcação, o quociente dos fluxos de cálcio corresponde a um processo puramente difusional. Quando ambos os lados do manto eram banhados por uma solução de composição idêntica à da hemolinfa, o potencial eléctrico através da preparação era muito pequeno. Contudo, quando a concentração de cálcio nas soluções externas foi reduzida de 6mM para concentrações mais baixas (cerca de 1mM), o manto gerou um potencial transepitelial de cerca de 50 mV (mais positivo no lado da concha). A maior parte deste potencial foi gerado através do epitélio extrapaleal do manto (Istin e Kirschner, 1968). Estas observações indicam que o epitélio extrapaleal tem a polaridade característica dos epitélios em geral e que é capaz de realizar um transporte transcelular de iões.

Neste trabalho descrevemos o primeiro estudo das propriedades electrofisiológicas do EEM isolado em condições de curto-circuito. Este estudo foi realizado com o objectivo de caracterizar a natureza do potencial transepitelial e da corrente de curto circuito.

### 1-Materiais e Métodos

Os animais (*A. cygnea*) foram colhidos na lagoa de Mira, no Norte de Portugal, e mantidos em aquários com água desclorada e arejada e com sedimentos, trazidos do seu habitat normal, afim de servir minimamente como fonte alimentar. Experiências preliminares mostraram que sobrevivem tanto nestas condições como em



água colhida no seu meio natural. Considerou-se que os animais eram saudáveis quando a superfície interna da concha era lisa e brilhante e quando fechavam as valvas com vigor ao serem perturbados.

Os EEMs de ambos os mantos foram cuidadosamente dissecados "in situ". Fragmentos de 1.2 cm de diâmetro da área central foram montados em câmaras de Ussing. Conseguiu-se uma agitação adequada das soluções nas câmaras borbulhando carbogênio (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) através delas. Afim de evitar a evaporação a mistura de gás foi primeiramente saturada com vapor de água. Em algumas experiências, que se descreverão na secção dos Resultados, usou-se oxigênio puro saturado com vapor de água. Na maior parte das experiências o epitélio foi continuamente curto-circuitado por um sistema electrónico simples. A condutância transepitelial foi medida aplicando pulsos transepiteliais de 10 mV durante 15 segundos e registando os pulsos da corrente correspondentes. Nesta preparação a curva I/V é linear pelo menos entre -100 e +100 mV.

### 1.1-Soluções

A Tabela III.1 mostra a composição da hemolinfa, do líquido extrapaleal, da água da lagoa e da solução control usada nas experiências que a seguir se descrevem. Uma análise desta tabela mostra que a composição da hemolinfa é semelhante à do líquido extrapaleal como originalmente referiu Waele (1930) e mais tarde confirmou Crenshaw (1972b). Parte da diferença entre a concentração total de catiões e aniões medidos na hemolinfa ou no líquido extrapaleal é provavelmente devida à presença de bicarbonato. A concentração de cálcio na solução control (1 mM) é mais baixa que



a medida na hemolinfa ou líquido extrapaleal (6mM) porque se obtêm correntes e potenciais mais elevados com concentrações baixas de cálcio. Concentrações relativamente mais elevadas de potássio foram usadas pela mesma razão. Nas experiências de substituição iônica o sódio ou o potássio foram substituídos por colina, o bicarbonato de sódio foi substituído isotonicamente por manitol tendo-se adicionado 1-5 mM de TRIS-Cl (pH 7.2) e o cloreto foi substituído por sulfato ou gluconato mais manitol sendo a concentração de cálcio livre medida com um eléctrodo de cálcio e ajustada, quando necessário, pela adição de sulfato de cálcio ou de gluconato de cálcio respectivamente. O pH das soluções era de 7.1-7.2 excepto em soluções com bicarbonato e equilibradas com oxigénio puro ou em soluções sem bicarbonato e equilibradas com carbogénio.

TABELA III.1. Composição iónica e osmolalidades da hemolinfa, líquido extrapaleal, água da lagoa e solução control.

	N	Os (mOsm kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> (mM)	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	Cl <sup>-</sup> (mM)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)
Hemolinfa	(16)	56.9±0.55	5.58±0.14	1.0±0.05	20.8±0.80	0.71±0.03	15.2±1.20	
líq. Extrap.	(16)	54.7±1.30	6.10±0.31	1.0±0.04	20.1±0.82	0.84±0.08	14.9±1.20	
Água da Lagoa	(4)	22.0	1.64	0.42	1.39	0.48	5.3	
Sol. Control	(4)	55.0	1.0	0.5	18.0	7.0	18.0	10.0

Osmolalidades determinadas por depressão do ponto de congelação.

Cálcio e magnésio medidos por absorção atómica.

Sódio e potássio medidos por fotometria de chama.

Cloretos medidos por coulometria.

Antes de se determinar a osmolalidade e a composição iónica dos mesmos líquidos as amostras de água, de líquido extrapaleal e de hemolinfa foram centrifugadas a 12.000 g numa ultracentrífuga Sorval R5 para eliminar as substâncias em suspensão.



A osmolalidade das soluções foi medida com um osmômetro Knaub Halbmikro. O osmômetro foi calibrado no início e periodicamente ao longo das leituras com três padrões diferentes (0 mosM (água); 200mosM e 400mosM) tendo-se utilizado amostras de 150 µl.

O doseamento do sódio e potássio nos líquidos acima citados foi feito num fotômetro de chama Eppendorf B700. A concentração de sódio e potássio foi calculada, em amostras de 200µl diluídas em 5ml de água, a partir de curvas padrão de 0,15 mEq/L; 0.3 mEq/L; 0,45 mEq/L para o sódio e 0.04 mEq/L; 0.08 mEq/L; 0.12 mEq/L para o potássio.

O cálcio e o magnésio foram medidos em amostras previamente tratadas com ácido nítrico (100 µl da amostra + 2 ml de ácido nítrico diluído 1/4) em banho-maria até à fervura, durante 15 minutos. Após arrefecimento, as amostras foram diluídas em 10 ml de água destilada e lidas num espectrofotômetro de absorção atômica Variam AA175. A concentração de cálcio e magnésio foi lida em curvas padrão de 2 µg/ml; 4 µg/ml; 6 µg/ml para o cálcio e de 0.1µg/ml; 0.4 µg/ml; 0.6 µg/ml para o magnésio.

Os cloretos foram lidos no clorímetro Aminco-Cotlove a partir de amostras de 2 ml a que se acrescentaram 2 ml da mistura de ácido nítrico 0.1N + 10% de ácido acético glacial. As concentrações foram então lidas numa curva padrão de 10 mEq/L; 15 mEq/L; 30 mEq/L.

### 1.2-Medições de fluxos de isótopos

Os fluxos de radioisótopos ( $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{14}\text{C}$ -bicarbonato,  $^{86}\text{Rb}$  e  $^{22}\text{Na}$ ) foram medidos pelo mesmo processo básico. A solução quente foi preparada adicionando a um volume determinado de solu-



ção control contendo uma quantidade total do ião (Q) uma quantidade adequada de radioisótopo ( $R^0$ ) de modo a obter uma actividade específica ( $a^0$ ) de  $0.01 \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$  sendo a actividade específica definida por:

$$a^0 = R^0/Q$$

Os dois mantos retirados do mesmo animal foram usados simultaneamente, um para medições de fluxos da hemolinfa para a concha e outro para medições de fluxos na direcção oposta. Foi fixado um período de estabilização de pelo menos uma hora antes de se iniciar a recolha de amostras. Fizeram-se colheitas da solução "fria" em três períodos de 20-30 minutos para cada situação. No final de cada período a câmara fria foi completamente esvaziada para contagem e colheu-se uma pequena amostra do lado quente para se medir a actividade específica. No caso dos fluxos de bicarbonatos, no início de cada período encheram-se ambas as meias câmaras com solução control pré-equilibrada com carbogénio. A solução quente foi preparada adicionando o isótopo depois de equilibrada com carbogénio. As câmaras foram então rolhadas sem fase gasosa.

O cálculo dos fluxos foi feito a partir da radioactividade total (R) no líquido do lado "frio" (depois de subtrair o "ruído de fundo") e da actividade específica ( $a^0$ ) na solução do lado quente segundo a fórmula:

$$F = R/a^0 = R/R^0 \cdot Q \quad (\text{moles})$$

O fluxo F corresponde à quantidade total do ião transportado durante o período da colheita. Este valor foi então dividido pelo tempo da colheita em segundos (t) e corrigido para  $1 \text{ cm}^2$  de área de epitélio (A).

Portanto o fluxo J é dado pela relação:



$$J = F/tA \text{ moles.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

Para comparação com os fluxos medidos por radioisótopos, as correntes de curto-circuito registadas durante os mesmos períodos foram convertidas em fluxos. Para o efeito foi calculado um valor médio da corrente para cada período e dividido pelo Faraday (96500 coulombs. eq<sup>-1</sup>). O valor médio da corrente obteve-se calculando, a partir dos registos da corrente de curto-circuito, a área por debaixo do traçado da corrente para cada período e dividindo o valor obtido pela duração do período em segundos.

TABELA III.2. Fluxos iónicos em condições de curto-circuito.

Ião	(N)	(hemolinfa → concha)			(concha → hemolinfa)			Net
		I <sub>cc</sub>	J <sub>H→C</sub>	J <sub>H→C</sub> /I <sub>cc</sub>	I <sub>cc</sub>	J <sub>C→H</sub>	J <sub>C→H</sub> /I <sub>cc</sub>	
Ca <sup>++</sup>	(12)	6.09 ±0.31	0.32 ±0.01	0.05 ±0.00	5.02 ±0.16	0.37 ±0.02	0.07 ±0.01	0.02 ±0.01
Cl <sup>-</sup>	(15)	4.91 ±0.06	0.61 ±0.12	0.13 ±0.02	5.99 ±0.21	0.76 ±0.04	0.13 ±0.01	0.001±0.03
Rb <sup>+</sup>	(15)	3.49 ±0.43	0.30 ±0.04	0.15 ±0.04	3.48 ±0.29	0.43 ±0.06	0.13 ±0.02	-0.03 ±0.04
Na <sup>+</sup>	(12)	4.03 ±0.36	0.45 ±0.05	0.12 ±0.01	3.48 ±0.32	0.75 ±0.12	0.27 ±0.06	0.15 ±0.05
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(13)	6.45 ±0.34	6.12 ±0.52	1.01 ±0.11	6.56 ±0.31	13.17±0.91	2.03 ±0.13	1.02 ±0.10
(DIDS) (.5mM)		0.06 ±0.04	6.65 ±0.39		0.00 ±0.02	5.60 ±0.38		

Fluxos (J) e correntes de curto-circuito (I<sub>cc</sub>) expressos em mol.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>×10<sup>10</sup>.

Isótopos usados: <sup>45</sup>Ca, <sup>36</sup>Cl, <sup>86</sup>Rb, <sup>22</sup>Na, <sup>14</sup>C-HCO<sub>3</sub>.

H→C Fluxos do lado da hemolinfa para o lado da concha.

C→H Fluxos do lado da concha para o lado da hemolinfa.

Para cada preparação e para cada período o valor do fluxo medido por radioisótopos foi dividido pela corrente de curto-circuito média do mesmo período dividida pelo Faraday. Deste modo os fluxos foram expressos como fracção da corrente de curto-circuito. O fluxo líquido foi obtido por diferença dos valores fraccionais (rácios) médios nas duas direcções. Os isótopos <sup>45</sup>Ca, <sup>36</sup>Cl e <sup>14</sup>C-Bicarbonato foram medidos por contagem (beta) em cintilação líquida (Beckman LS 8100) em solução de Bray. Os isótopos <sup>86</sup>Rb e



<sup>22</sup>Na foram medidos por contagem (gamma) em cintilação com cristal de poço (Picker Pace 1). Todas as amostras foram lidas até um mínimo de 10.000 desintegrações (counts).

### 1.3-Determinação química da água e dos conteúdos iônicos

O EEM isolado foi incubado durante uma hora em solução arejada com carbogênio, contendo 0.2  $\mu$ Ci de <sup>14</sup>C-inulina por ml de solução. A escolha deste marcador foi feita com base em três requisitos: não penetra nas células durante o período experimental; não é tóxico; equilibra-se nos espaços extracelulares à mesma concentração da solução. As preparações foram então secas com papel de filtro (Whatman, 542), colocadas em cápsulas de alumínio pré-taradas, pesadas (peso húmido) e desidratadas a 100 °C, durante aproximadamente 24 horas, até se obter um peso constante (peso seco). Esta pesagem foi feita após prévio arrefecimento num excicador à temperatura ambiente. As preparações foram transferidas para um tubo contendo quantidades apropriadas (5 ml) duma mistura de HNO<sub>3</sub> 0.1N + ácido acético glacial a 10%. O ácido acético nesta mistura foi usado a 10% dado ser essa a concentração utilizada no método para medição dos cloretos. Os tubos foram submetidos a uma agitação lenta, à temperatura ambiente, durante 24 horas para permitir a extração da <sup>14</sup>C-inulina, sódio, potássio e cloreto. A <sup>14</sup>C-inulina foi lida por contagem (beta) em cintilação líquida em solução de Bray. O sódio e o potássio foram determinados por fotometria de chama e os cloretos por coulometria. O volume de líquido celular, libertado pela digestão das amostras, é desprezível não alterando praticamente o volume total. Para a determinação do volume extracelular foram usadas amostras



de 2ml e 100 µl da solução de incubação com  $^{14}\text{C}$ -inulina (solução padrão) à qual se juntaram 2ml da mistura acima mencionada. A todas as amostras foram adicionados 10 ml de líquido de cintilação (solução Bray) e lidas num contador beta.

Sabendo o volume a que correspondem as contagens na solução padrão (100 µl) e conhecendo as contagens das amostras pode-se calcular o volume extracelular. A água total foi calculada a partir da diferença entre o peso húmido e o peso seco da preparação. O volume da água intracelular foi obtido pela diferença entre a água total e a água extracelular (equivalente ao espaço extracelular). Afim de calcular as concentrações iónicas intracelulares procedeu-se à determinação das quantidades totais de sódio, potássio (fotometria) e cloretos (coulometria) nas amostras. Usaram-se fracções de 1ml para o doseamento de sódio, potássio e 2ml para o doseamento de cloretos. No final todas estas determinações foram referenciadas ao volume total inicial das amostras (5ml).

A partir do volume de água extracelular obtido e das concentrações de sódio, potássio e cloretos na solução em que as amostras foram digeridas calcularam-se as quantidades destas espécies iónicas no espaço extracelulares. O doseamento de sódio, potássio e cloretos na água intracelular foi determinado pela diferença entre o conteúdo iónico total e o extracelular.

As quantidades iónicas obtidas foram expressas ou por kilo de água a intracelular ou por kilo de peso seco do epitélio. As concentrações aqui usadas foram expressas em mmol/kg de água intracelular.



#### 1.4-Microelétrodos

Os microelétrodos convencionais foram feitos a partir de capilares de vidro borosilicato com diâmetro externo de 1.2 mm e com filamento de vidro no interior. Os vidros capilares foram estirados num estirador de microelétrodos (Narishige) obtendo-se eléctrodos com pontas inferiores a 0.1  $\mu$ m e resistências superiores a 300 megohms quando cheios com acetato de potássio 0.5M + KCl 10 mM e mergulhados no Ringer control. As picadas foram consideradas satisfatórias quando havia: uma mudança nítida de potencial após a penetração na célula; leituras estáveis durante pelo menos 20 minutos; uma alteração na resistência do eléctrodo, após penetração, menor que 30%; retorno ao mesmo potencial ( $\pm 5$  mV) quando o eléctrodo foi removido da célula. A maior parte das picadas foram executadas do lado da hemolimfa, por serem mais fáceis do que do lado da concha. Os resultados obtidos em ambos os casos foram idênticos.

Prepararam-se microelétrodos ionossensíveis a partir do mesmo vidro. Produziram-se inicialmente micropipetas duplas por torção a 360 °C seguida de estiramento. Uma delas foi silanizada com um tratamento de vapor de dimethyldichlorosilane ("simple room temperature method", Thomas, 1978) durante cerca de 1.5 minutos e colocados em estufa a 120 °C durante uma hora. Quando houve grandes variações da humidade ambiente foi necessário mudar ligeiramente esta técnica. A seguir encheu-se parcialmente a micropipeta silanizada com a resina Cl-lix Corning 477913 ou com a resina K-lix Corning 477317 completando-se o enchimento com KCl 100 mM. A outra pipeta (a de referência) foi cheia com acetato de K 0.5M + KCl 10 mM. Quando se encheu o eléctrodo de referência



com NaCl 2M obtiveram-se leituras semelhantes da concentração intracelulares de potássio. As medidas realizadas com microelectrodos sensíveis ao sódio não são referidas aqui dado que havia uma forte interferência do cálcio.

Fizeram-se curvas de calibração com soluções de KCl para se seleccionarem os microelétrodos sensíveis ao ião com curvas de resposta acima de 50 mV para variações da concentração de 10 vezes. No caso dos microelétrodos sensíveis a Cl a selecção foi efectuada através da calibração em soluções de KCl contendo 10 mM de bicarbonato de sódio. No decurso de cada experiência fizeram-se calibrações com dois padrões (acima e abaixo da concentração intracelular medida) para ambos os tipos de microelétrodos a fim de avaliar a estabilidade das respostas. Imediatamente antes da micropunção as saídas dos amplificadores dos microelétrodos de referência e ionossensível foram ajustadas a zero. Isto significa que os potenciais intracelulares medidos tiveram como referência (zero) a solução externa e que, na curva de calibração do eléctrodo ionossensível, a leitura correspondente à solução externa foi identificada com o valor zero. As concentrações intracelulares foram calculadas a partir das leituras obtidas quando o eléctrodo ionossensível estava dentro da célula e da curva de calibração respectiva. Procedeu-se à remoção do respectivo ião das soluções externas para verificar se haveria alguma interferência na leitura dos microelétrodos de Cl e de K. Quando se removeu o cloro dos banhos externos a leitura do microeléctrodo sensível ao cloro caiu em menos de 5 minutos para um valor correspondente a uma concentração que era 5% do valor control. No caso do potássio e ao fim de 10 minutos a leitura do



microeléctrodo correspondeu a menos que 10% da concentração control.

As medições com microeléctrodos foram realizadas numa câmara especialmente desenhada (Fig. III.1) em que a preparação foi montada como um diafragma horizontal de  $0.79 \text{ cm}^2$  assente numa rede de nylon. A preparação foi continuamente curto-circuitada. A condutância da membrana foi medida deslocando o potencial de membrana de 10 mV durante 15-30 segundos e registando o pulso de corrente correspondente. O deslocamento do potencial intracelular foi também registado e utilizado para calcular o quociente entre a resistência apical (e basolateral) e a resistência transcelular total. O valor desta razão indicava se o microeléctrodo estava ou não correctamente colocado.

A solução que banhava o lado da hemolinfa do epitélio será designada por "solução da hemolinfa" e a solução que banhava o lado da concha da preparação como a "solução da concha".

Usaremos os termos de "membrana apical" ou "barreira apical" para designar a membrana celular das células epiteliais que separa o compartimento intracelular da solução da concha. A outra membrana, que separa o compartimento intracelular da solução da hemolinfa, chamaremos "membrana basolateral" ou "barreira basolateral".

### 1.5-Métodos estatísticos

Todos os testes usados neste trabalho foram testes-t de significância (Hald, 1952). A hipótese testada em cada caso foi se um valor médio era diferente de zero. Os valores de p correspondem a erros de segunda espécie.



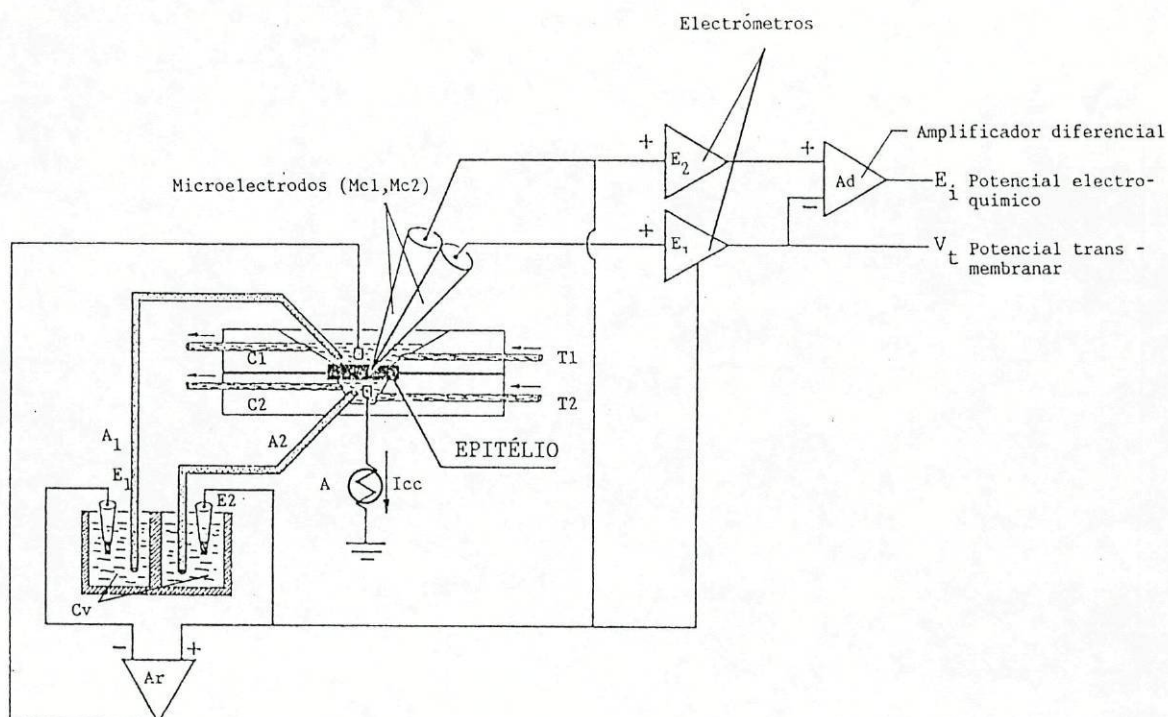


Fig. III.1 - Diagrama do dispositivo utilizado nas medições simultâneas de potenciais eléctricos intracelulares e de corrente de curto-circuito. Semi-câmaras ( $C_1$  e  $C_2$ ) com a preparação epitelial; pontes de agar ( $A_1$  e  $A_2$ ); eléctrodos calomelanos ( $E_1$  e  $E_2$ ); cuvetes com KCl saturado ( $C_v$ ); tubos para circulação das soluções ( $T_1$  e  $T_2$ ); amperímetro para medição da corrente trans-epitelial ( $A$ ); amplificador de realimentação ( $Ar$ ); electrómetros ( $E_1$  e  $E_2$ ) para medição de potenciais eléctricos (com microeléctrodos convencionais  $Mc_1$ ) e potenciais electroquímicos (com microeléctrodos iono-sensíveis  $Mc_2$ ); Amplificador diferencial usado para o cálculo do potencial analógico do potencial químico intracelular ( $Ad$ ); potencial electroquímico ( $E_i$ ) e potencial transmembranar ( $V_t$ ).

## 2-Resultados

O EEM é banhado "in vivo" pela hemolinfa e pelo líquido extrapaleal. A composição destes líquidos foi referida por Waele (1930) e Crenshaw (1972) como sendo muito semelhante. Nós obtivemos resultados idênticos (Tabela III.1).

Quando o EEM é montado em câmaras de Ussing banhado de ambos os lados pela mesma solução gera-se espontaneamente um potencial eléctrico transepitelial. Em curto-circuito mede-se uma corrente positiva do lado da hemolinfa para o lado da concha. A Figura III.2 apresenta medições de correntes de curto-circuito (círculos) e condutâncias (quadrados) obtidas em dois grupos de oito pares de EEM, correspondendo cada par a um animal. As preparações foram banhadas em solução control. Um grupo (símbolos a cheio) foi estudado em Fevereiro e outro (símbolos abertos) em Novembro. Em ambos os grupos houve um transitório de corrente inicial seguido de um período estável que durou várias horas. A condutância média evoluiu de maneira semelhante. Contudo, o comportamento destes dois grupos foi diferente. Em Fevereiro o transitório inicial consistiu num decréscimo simultâneo da corrente e da condutância e, dado que a queda de corrente foi mais pronunciada, houve também uma queda do potencial em circuito aberto que não está representado na Figura III.2. Em Novembro houve um aumento inicial, embora pequeno, da corrente e voltagem (não representada), tendo a condutância variado muito pouco.

A Figura III.3 mostra os valores médios das correntes de curto-circuito (círculos abertos), voltagens em circuito aberto (quadrados) e condutâncias (círculos abertos) obtidos em mantos



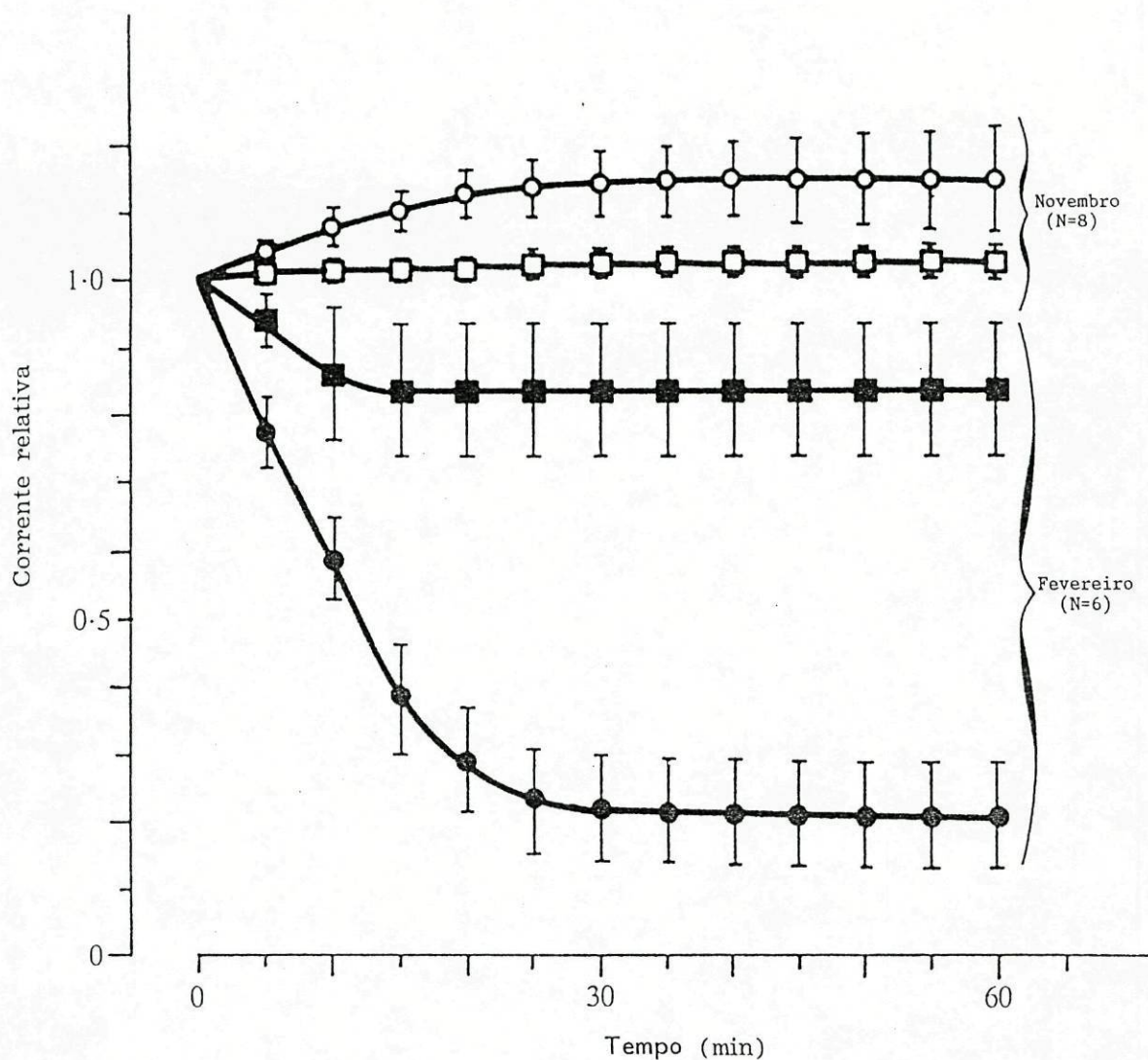


Fig. III.2 - Transitórios iniciais de correntes de curto-circuito (círculos) e das condutâncias (quadrados). Os valores representados são as médias  $\pm$ EPM das medidas obtidas no instante  $t$  divididas pelos valores no tempo zero. Os símbolos a cheio correspondem a preparações estudadas em Fevereiro ( $n=12$ ) e os símbolos abertos às preparações estudadas em Novembro ( $n=12$ ). No tempo zero as médias das correntes medidas em Novembro e Fevereiro foram  $41.3$  e  $23.4 \mu\text{A cm}^{-2}$ , respectivamente.

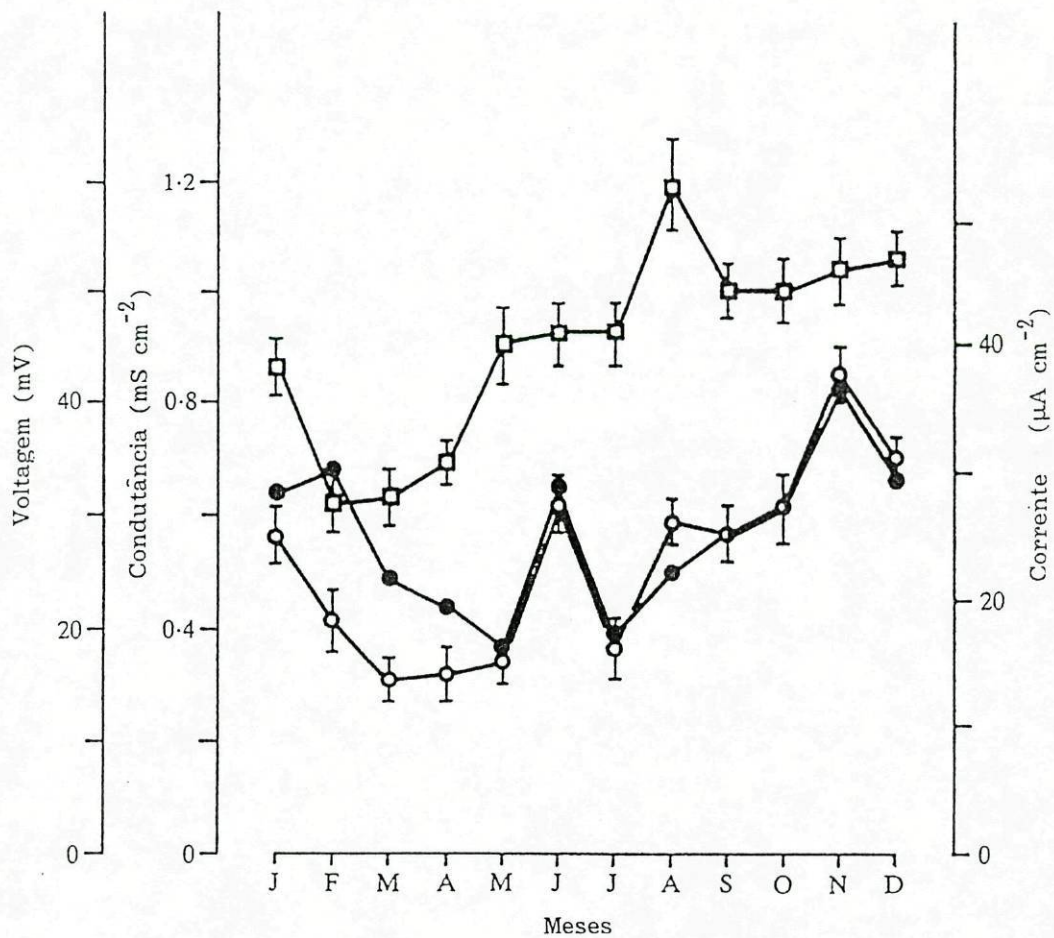


Fig. III.3 - Médias mensais  $\pm$ EPM. das correntes (círculos abertos), condutâncias (quadrados) e dos potenciais (círculos fechados) medidos em grupos de 24 animais ao longo de um período de três anos.



colhidos de grupos de 24 animais cada, estudados ao longo de um período de três anos. Pode-se verificar que estas variáveis sofrem alterações cíclicas durante o ano. As correntes e voltagens mais baixas foram registradas em Março-Abril ( $13.6 \pm 1.9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  e  $23 \pm 2.7 \text{ mV}$ ) e os valores mais altos em Novembro ( $37.9 \pm 2.3 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  e  $40.9 \pm 2.2 \text{ mV}$ ). Em Agosto e Setembro obtiveram-se correntes e voltagens estáveis e relativamente elevadas. Grande número de experiências descritas abaixo foram realizadas durante este período.

## 2.1-Efeito de substituições iônicas e do dióxido de carbono

Estudos com microelétrodos realizados por Sorenson *et al.* (1980) mostraram que a permeabilidade relativa das membranas apical e basolateral ao sódio era pequena. A Figura III.4 descreve o efeito sobre a corrente de curto-circuito e a condutância, resultante da substituição de sódio ou potássio por colina e de cloro por sulfato nas soluções. As substituições iônicas foram feitas depois das correntes e condutâncias terem atingido valores estáveis. Os valores representados correspondem às médias e erros padrões das médias dos quocientes entre as medições levadas a cabo numa determinada condição experimental, por exemplo após substituição de sódio por colina, e as medições realizadas quando a preparação era banhada pela solução control. Quando se substituiu o sódio por colina na solução da hemolinfa a corrente caiu cerca de 13%. Esta queda foi estatisticamente diferente de zero ( $p < 0.01$ ). A substituição na solução da concha originou uma queda de corrente de 8% ( $p < 0.01$ ). Quando o sódio foi substituído por colina em ambos os lados a corrente não se alterou. Nas mesmas



experiências a condutância total da preparação não mudou quando o sódio foi removido do lado da concha e houve uma queda de 10% quando foi removido de ambos os lados ( $p < 0.01$ ) ou do lado da hemolinfa ( $p < 0.01$ ). Estes resultados mostram que o fluxo de sódio contribui muito pouco para a corrente de curto-circuito e que a permeabilidade relativa da preparação ao sódio é também muito pequena.

Sorenson *et al.* (1980) observaram uma despolarização da membrana apical após a substituição do cloro por propionato na solução da concha em condições de circuito aberto. Em condições de curto-circuito, quando se substituiu o cloro por sulfato no lado da hemolinfa, a corrente caiu 36% ( $p < 0.01$ , Fig. 3) e a condutância total diminuiu 15% ( $p < 0.01$ ). Quando o cloro foi substituído no lado da concha, a corrente e a condutância diminuíram menos que 5% ( $p < 0.1$  em ambos os casos) enquanto que a substituição do cloro nos dois lados causou uma queda na condutância de cerca de 21% ( $p < 0.01$ ) e um decréscimo na corrente de 13% ( $p < 0.01$ ). Estas observações sugerem que a membrana basolateral é relativamente permeável ao cloro. Contudo, a queda de corrente observada após a remoção do cloro do lado da hemolinfa não pode atribuir-se à corrente difusional, resultante do gradiente de concentração do cloro através da preparação criado pela remoção do cloro, dado que um fluxo difusional líquido de cloro em direcção ao lado da hemolinfa causaria um aumento na corrente de curto-circuito. A corrente de curto-circuito não parece ser devida a um fluxo líquido de cloro (do lado da concha para o da hemolinfa) pois que, se assim fosse, a remoção do cloro da solução da concha deveria provocar uma redução substancial da corrente de curto-



circuito.

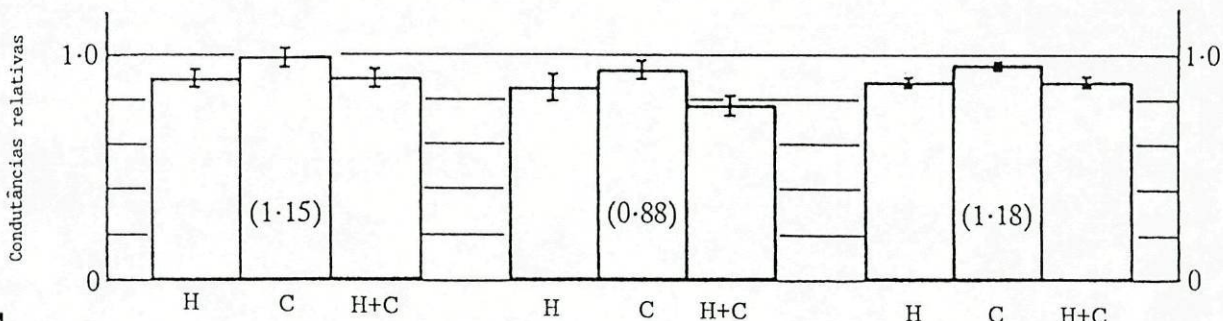
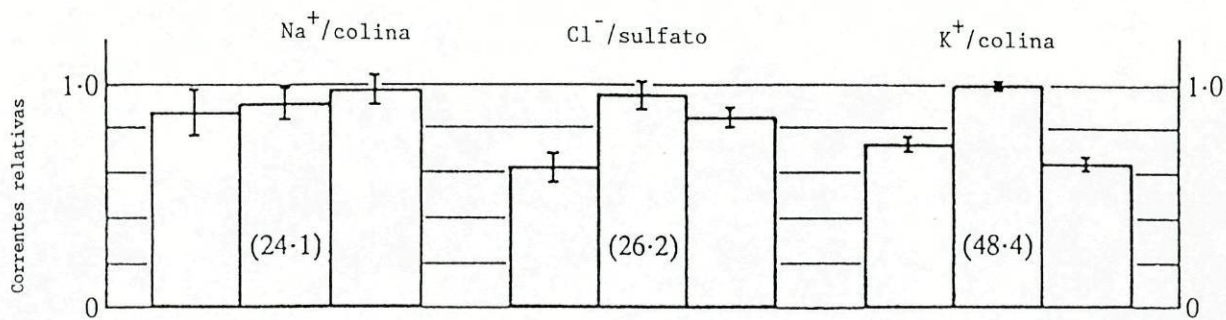
Quando se substituiu potássio por colina (Fig. III.4) no lado da hemolinfa houve uma queda da corrente de curto-circuito de 24% ( $p < 0.01$ ) enquanto que a condutância diminuiu 11% ( $p < 0.01$ ). Obteve-se um efeito semelhante quando o potássio foi substituído em ambos os lados (34% e 12% respectivamente). A remoção do potássio do lado da concha não afectou a corrente e teve um efeito muito pequeno na condutância.

A dependência da corrente de curto-circuito em relação aos bicarbonatos não pode ser estudada isoladamente visto que uma solução preparada sem bicarbonato e equilibrada com carbogénio tem um pH de cerca de 5. Istin e Kirschner (1980) observaram que a remoção de dióxido de carbono de ambos os lados, mantendo o bicarbonato nas soluções, induzia um colapso do potencial em circuito aberto. Nós estudámos o efeito da remoção de dióxido de carbono da mistura gasosa e da remoção de bicarbonato separadamente ou simultaneamente. Os resultados obtidos podem ver-se na Figura III.5 onde foi usado o mesmo método de representação da Figura III.4. A remoção de  $\text{CO}_2$  ou de bicarbonato ou ambos do lado da hemolinfa não teve nenhum efeito quer na corrente quer na condutância. A remoção de  $\text{CO}_2$  do lado da concha provocou uma queda de 30% mas teve pouco efeito na condutância enquanto que a remoção apenas do bicarbonato do lado da concha causou uma queda na corrente de 88% e um decréscimo na condutância de 30%. Este efeito pode ser devido, pelo menos em parte, a um decréscimo no pH (de 7.2 para cerca de 5) da solução da concha. O efeito do pH pode-se ver também na Figura III.5. Quando se removeu simultaneamente o  $\text{CO}_2$  e o bicarbonato da solução da concha e se manteve

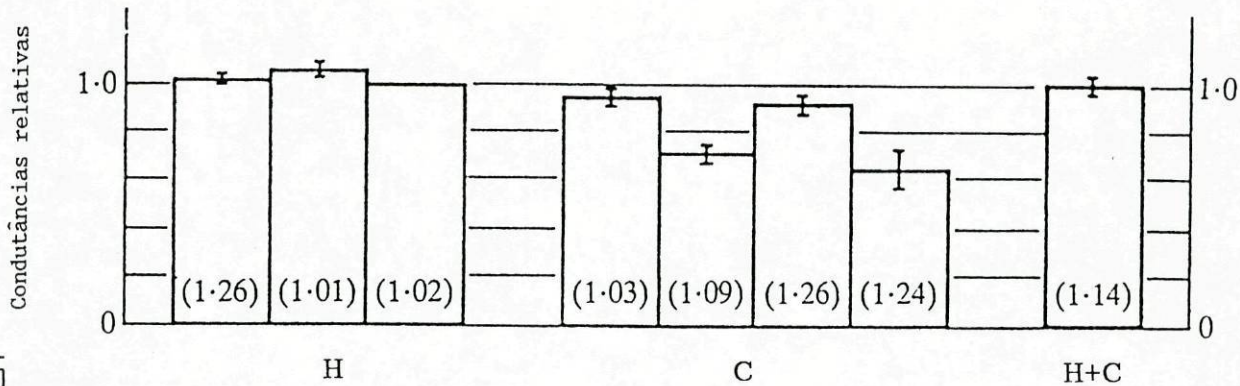
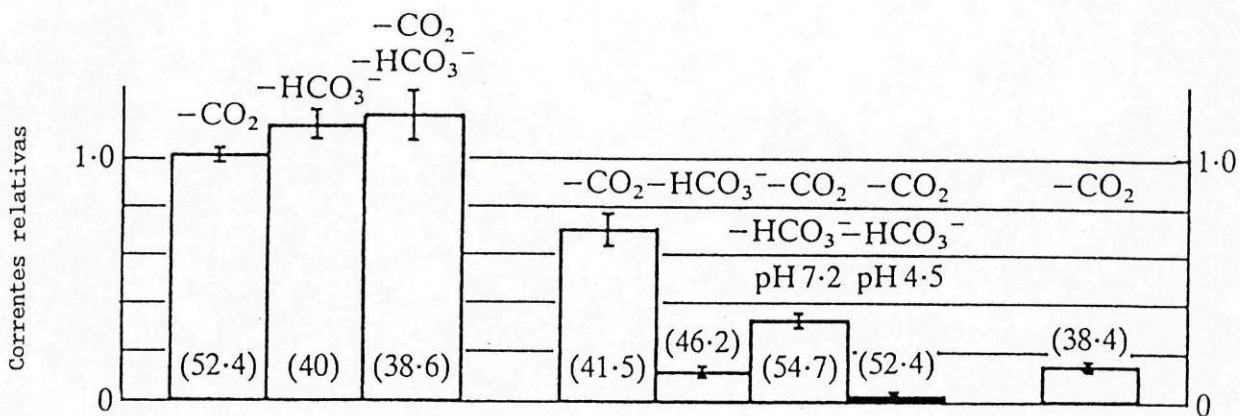
Fig. III.4 - Influência do sódio, cloro e potássio na corrente de curto-circuito e condutância. Cada grupo de três barras (para correntes e condutâncias) representa um tipo de experiências (substituição de Na, Cl ou K) realizados em 16 mantos (de 8 animais). A preparação foi primeiramente banhada pela solução control. Quando a corrente estabilizou realizou-se a substituição iônica. Depois de atingir um novo plateau a solução control foi reintroduzida na câmara. Foi calculada a média destes dois períodos de control e a leitura do período experimental foi dividida por esta média para se obterem os valores relativos. A sequência das mudanças foi diferente em cada experiência. O sódio e o potássio foram substituídos por colina e o cloro por sulfato+manitol. As médias  $\pm$ EPM correspondem às alterações relativas. Os valores entre parêntesis são as médias absolutas dos valores control para cada grupo de experiências. As correntes estão expressas em  $\mu\text{A cm}^{-2}$  e as condutâncias em  $\text{mS cm}^{-2}$ . H: substituição no lado da hemolinfa; C: substituição no lado da concha; H+C: substituição em ambos os lados.

Fig. III.5 - Influência do bicarbonato e dióxido de carbono na corrente de curto-circuito e na condutância. Utilizaram-se mantos de 12 animais. O desenho das experiências e o método de representação está descrito na Fig. 3. O bicarbonato de sódio foi substituído por manitol + TRIS-Cl (pH 7.2). Os valores médios das correntes control (em  $\mu\text{A cm}^{-2}$ ) e das condutâncias (em  $\text{mS cm}^{-2}$ ) são dados entre parêntesis na base de cada barra. As primeiras três barras mostram os efeitos da remoção de  $\text{CO}_2$ , de bicarbonato ou de ambos no lado da hemolinfa (H) sobre as correntes e condutâncias. As quatro barras seguintes correspondem a mudanças idênticas realizadas no lado da concha (C). O efeito da remoção de  $\text{CO}_2$  e de bicarbonato no lado da concha foi estudado a dois valores de pH (7.2 e 4.5). A última barra refere o efeito de remoção de  $\text{CO}_2$  de ambos os lados (H+C).





4



5

o pH a 7.2 com TRIS-Cl a 5 mM a corrente caiu 67% , mas a condutância caiu apenas 8%. A remoção do CO<sub>2</sub> e do bicarbonato a pH 4.5 reduziu a corrente em 92% e a condutância em 33%. A remoção de CO<sub>2</sub> de ambos os lados reduziu a corrente em 85% mas a condutância não variou.

## 2.2-Efeito de inibidores

A Figura III.6 mostra o efeito de vários inibidores sobre a corrente. O DIDS (painel A) e o SITS (painel B), ambos numa concentração 0.5 mM, não actuaram do lado da concha mas quando adicionados ao lado da hemolinfa induziram uma rápida queda seguida de uma inibição progressiva que, no caso do DIDS, foi quase completa ao fim de uma hora.

Istin e Kirschner (1968) tinham descrito que na ausência de CO<sub>2</sub> o potencial eléctrico transepitelial aumentava na presença de DNP. Como se pode verificar a partir da Figura III.6 (painel C), em curto-circuito e na presença de CO<sub>2</sub>, o DNP (1mM) teve o mesmo efeito de qualquer dos lados. A corrente desceu para 70% do valor control. Contudo, quando a droga foi adicionada do lado da concha, ocorreu um transitório inicial correspondendo a uma queda nítida para menos de 40% do valor inicial seguido de um aumento igualmente nítido para cerca de 70%, enquanto que a adição do lado da hemolinfa causou uma queda ligeiramente mais lenta para 70% do valor control.

A iodocetamida numa concentração 1mM (painel D), actuou igualmente bem de qualquer dos dois lados. Esta droga originou uma inibição quase completa da corrente de curto-circuito em menos de 15 minutos.



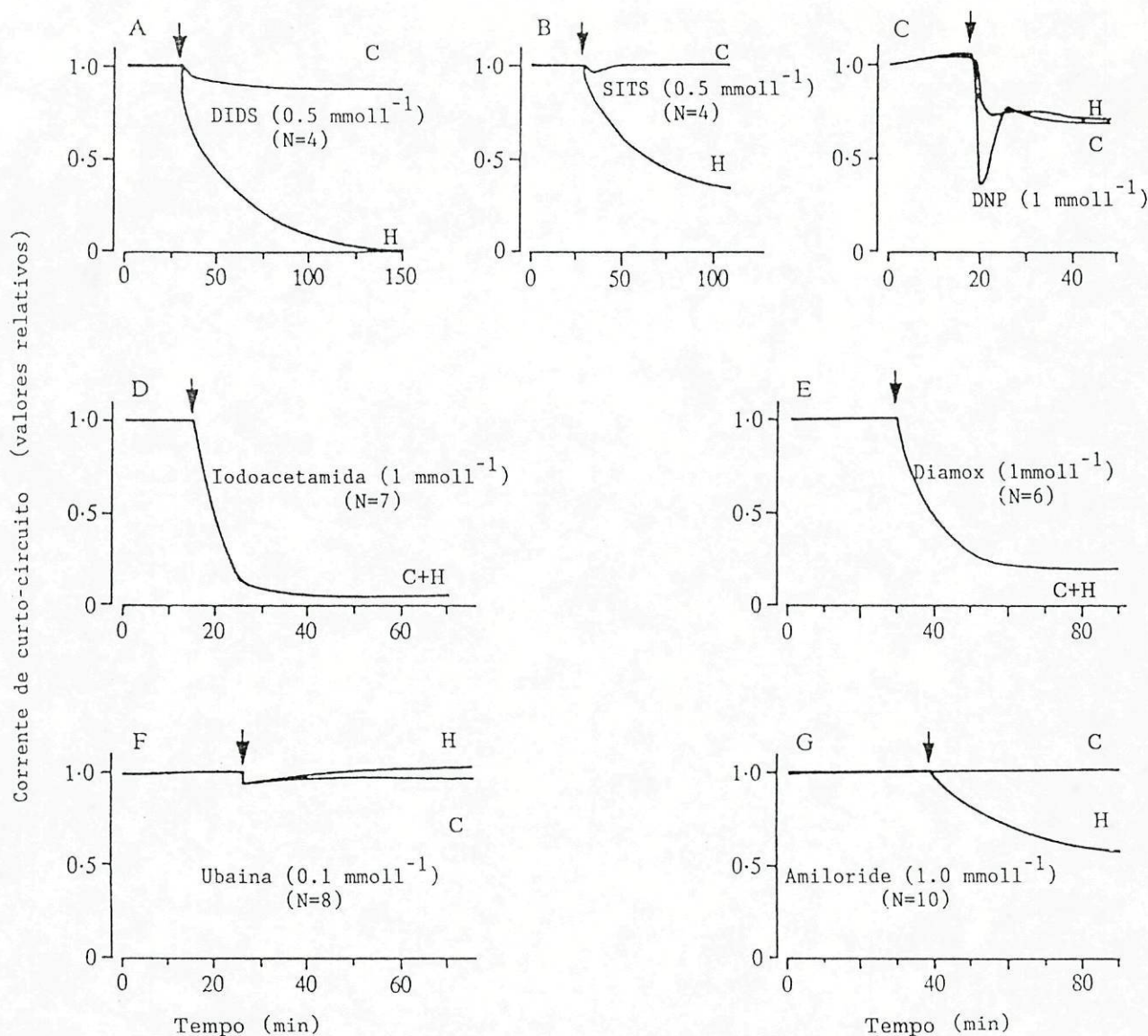


Fig. III.6 - Efeito de inibidores metabólicos e de transporte. O efeito de cada inibidor foi estudado em pares de mantos (número entre parêntesis). As preparações foram banhadas em solução control. Os valores representados são as médias relativas entre os valores medidos em cada instante  $t$  e os valores medidos imediatamente antes de adicionar o inibidor. H, inibidor adicionado no lado da hemolinfa; C, inibidor adicionado no lado da concha; H+C, inibidor adicionado em ambos os lados. Os erros padrões da média foram (A) DIDS, 0.07; (B) SITS, 0.03; (C) DNP, 0.06; (D) iodoacetamida, 0.05; (E) diamox, 0.04; (F) ubaína, 0.04; (G) amiloride, 0.06. A concentração usada para cada inibidor está registada no painel correspondente.

O diamox também numa concentração 1mM (painel E), inibiu progressivamente a corrente de curto-circuito que caiu para 20% do valor control ao fim de uma hora. Este efeito é consistente com as observações de Istin e Kirschner (1968) que mostraram a inibição do potencial em circuito aberto por esta droga.

Quando se adicionou ubaína (painel F) numa concentração 0.1mM a qualquer dos dois lados a corrente permaneceu praticamente constante.

O amiloride numa concentração 1mM (painel G) não teve nenhum efeito do lado da concha, mas produziu uma progressiva e lenta inibição do lado da hemolinfa. A corrente caiu para 50% do valor control ao fim de uma hora.

Como conclusão, o efeito do DIDS parece implicar um trocador de aniões (Boron, 1983) e a inibição pelo amiloride indica o possível envolvimento de um trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ambos na membrana basolateral.

### 2.3-Fluxos iônicos

A Tabela III.2 mostra um conjunto de medições de fluxos de cálcio (1mM) em curto-circuito. Os fluxos unidireccionais medidos foram pequenos (menos que 16% da corrente de curto circuito) e o fluxo líquido foi cerca de 4% da corrente de curto-circuito. Os fluxos de cloro e de rubídio (usado como marcador de potássio) também foram pequenos. A Tabela III.2 mostra ainda que há um pequeno fluxo líquido de sódio (-15% da corrente de curto-circuito), no sentido da hemolinfa, que é estatisticamente significativo.

Se os fluxos unidireccionais de  $^{14}\text{C}$  corresponderam ao movimen-



to do bicarbonato, o fluxo líquido foi inteiramente responsável pela corrente de curto-circuito e foi quase completamente inibido quando se adicionou DIDS (0.5mM) ao compartimento da hemolinfa. Dado que na presença de DIDS o fluxo do lado da hemolinfa para o lado da concha não foi afectado (aumentou ligeiramente), é pouco provável que este fluxo seja mediado por um mecanismo de troca aniónica. Os fluxos unidireccionais elevados de  $^{14}\text{C}$  da hemolinfa para a concha observados na presença de DIDS podem ser devidas à difusão de  $\text{CO}_2$  marcado, como já tinha sido observado na mucosa do colon de anfíbios (Cooperstein e Hogben, 1959; Carlin-sky e Lew, 1970).

#### 2.4-Estudos com microelétrodos

Com o objectivo de analisar os mecanismos responsáveis pela génese dos potenciais de membrana fizeram-se picadas com micro-elétrodos. Os resultados obtidos estão representados na Tabela III.3. As correntes de curto-circuito e as voltagens em circuito aberto registadas nas câmaras usadas para estas experiências foram consideravelmente mais baixas que as medidas nas câmaras de Ussing. Isto deveu-se muito provavelmente ao facto de não se terem conseguido concentrações adequadas de  $\text{CO}_2$  nos banhos das câmaras de microelétrodos.

Para um potencial transepitelial médio de  $11 \pm 1.5$  mV ( $n=42$ ) em circuito aberto, com o lado da concha positivo, o potencial intracelular médio em curto-circuito foi de  $31 \pm 0.5$  ( $n=65$ ) em relação ao lado da hemolinfa ou da concha. A resistência da membrana apical correspondeu a 80% da resistência transcelular ( $0.8 \pm 0.02$ ;  $n=48$ ).



TABELA III.3. Potencial e concentrações iônicas intracelulares em curto-circuito.

$[Cl^-]$	$[Cl^-]/[Cl^-]_{eq}$	$[K^+]$	$[K^+]/[K^+]_{eq}$	$[Na^+]$	Método
7.39 $\pm$ 3(30)	1.3 $\pm$ 0.07(30)	26.5 $\pm$ 1.1	1.16 $\pm$ 0.05(16)		Microeléctrodo ionossensitivo
12.9 $\pm$ 0.61(20)		29.4 $\pm$ 0.4(20)		14 $\pm$ 0.4(20)	Fotometria de chama
$V_{ic}$	$I_{cc}$	$g_T$	$R_c/R_{c+Rh}$	$V_{ca}$	
-31 $\pm$ 0.5(65)	11.5 $\pm$ 0.9(46)	1.4 $\pm$ 0.13(42)	0.8 $\pm$ 0.02(48)	-11.1 $\pm$ 1.5(42)	

Estão representados os valores de correntes de curto-circuito ( $I_{cc}$ ), voltagens em circuito aberto ( $V_{ca}$ ) e condutâncias epiteliais ( $g_T$ ) obtidas na mesma preparação.

$[Cl^-]_{eq}$  e  $[K^+]_{eq}$  são concentrações intracelulares em equilíbrio de  $Cl^-$  e  $K^+$  calculadas a partir do potencial intracelular e das concentrações extracelulares correspondentes. Todas as concentrações são expressas em mmol/kg de água.

$R_c/R_{c+Rh}$  é obtida a partir do quociente entre a queda potencial através da barreira apical e a queda de potencial através do epitélio total quando um pulso de 10 mV é aplicado através da preparação.

As correntes são expressas em  $\mu A\ cm^{-2}$ ; as condutâncias em  $mS\ cm^{-2}$ ; as voltagens em mV. O número das experiências está entre parêntesis.

$V_{ic}$  é o potencial eléctrico intracelular (em mV) em relação ao potencial eléctrico das soluções externas.  $V_{ca}$  é o potencial eléctrico transepitelial (em mV) em circuito aberto quando a corrente transepitelial é zero. O lado da concha é usado como referência.

A fim de detectar diferenças relativas de permeabilidade das barreira apical e basolateral ao sódio, potássio e cloro, estes iões foram substituídos por colina (catiões) e por sulfato ou gluconato (cloro) na solução externa. Os potenciais intracelulares foram medidos em condições de curto-circuito.

A remoção de sódio, potássio e cloro da solução da hemolinfa produziu pequenas hiperpolarizações ( $-2.86 \pm 0.55$  n=7,  $-1.88 \pm 0.33$  n=4 e  $-7.19 \pm 0.26$  (n=20) mV respectivamente). Substituições idênticas realizadas no lado da concha produziram uma hiperpolarização respectivamente de  $-3.8 \pm 0.38$  (n=4) mV depois da remoção do sódio,  $-0.33 \pm 0.33$  (n=6) depois da remoção do potássio e  $-1.58$



$\pm 0.02$  (n=6) mV depois da remoção do cloro.

Quando o cálcio aumentou para 6 mM na solução da hemolinfa o potencial intracelular aumentou de  $13.9 \pm 1.1$  mV (n=7). Alterações semelhantes na solução da concha originaram uma despolarização mais pequena de  $3.7 \pm 0.9$  mV (n=4).

Na Tabela III.3 estão também representadas as concentrações iónicas intracelulares determinadas com os microelétrodos sensíveis a iões. Para comparação os valores obtidos com métodos químicos também são fornecidos. A concentração de cloro intracelular medida com microelétrodos sensíveis a Cl foi de  $7.9 \pm 0.3$  mM (n=30). Este valor foi 30% mais elevado que o valor médio de equilíbrio calculado a partir dos potenciais de membrana e da concentração de cloro externa. O valor médio obtido pela análise química foi de  $12.9 \pm 0.6$  mM (n=20). A concentração intracelular do potássio determinada com microelétrodos foi de  $26.5 \pm 1.1$  mM (n=16). Este valor foi 10% mais elevado do que o valor de equilíbrio. A concentração intracelular média determinada por fotometria de chama foi de  $29.4 \pm 0.4$  mM (n=20). Apesar de se terem realizado picadas com microelétrodos sensíveis ao sódio, os resultados não são apresentados na Tabela III.3 por se ter verificado que, para as baixas concentrações de sódio da solução control, havia uma forte interferência pelo cálcio. O valor médio obtido pelo fotómetro de chama foi de  $14 \pm 0.4$  mM (n=20).

Com o objectivo de se encontrar uma possível dependência entre os fluxos de bicarbonatos e os fluxos de cloro, mediu-se a concentração intracelular do cloro antes e durante a remoção de bicarbonato da solução externa. Quando a solução da concha foi substituída por uma solução sem de bicarbonato a concentração



intracelular de cloro permaneceu constante. A Figura III.6 mostra uma experiência em que o bicarbonato foi retirado (primeira seta) e depois reintroduzido (segunda seta) na solução da hemolinfa. Nesta experiência a remoção de bicarbonato da solução da hemolinfa causou um aumento de cloro intracelular à taxa aproximada de  $0.3 \text{ mmol.s}^{-1}$ . O gráfico inserido da Figura III.7 apresenta os resultados obtidos em quatro mantos quando a mesma substituição foi concluída no lado da hemolinfa. Para cada manto, a concentração intracelular de cloro medida depois da remoção de bicarbonato do lado da hemolinfa foi dividida pela concentração de cloro medida antes da remoção de bicarbonato. Os valores representados correspondem às médias e erros padrões da média dos valores relativos das quatro experiências.

## 2.5-Influência do cálcio sobre a corrente de curto-circuito e a voltagem em circuito aberto

Conforme se mencionou atrás a nossa solução control continha menos cálcio (1mM em vez de 6mM) e mais potássio (7 mM em vez de 0.7mM) que a hemolinfa ou o líquido extrapaleal. A Tabela III.4 contem os resultados obtidos quando a preparação foi primeiramente banhada pela solução control e depois pela solução contendo 6mM de cálcio. Adicionou-se manitol à solução control de modo a que as soluções usadas tivessem todas a mesma osmolalidade. O aumento de cálcio na solução externa provocou um pequeno decréscimo da corrente de curto-circuito (7%) um grande aumento na condutância (50%) e uma queda do potencial em circuito aberto (37%).



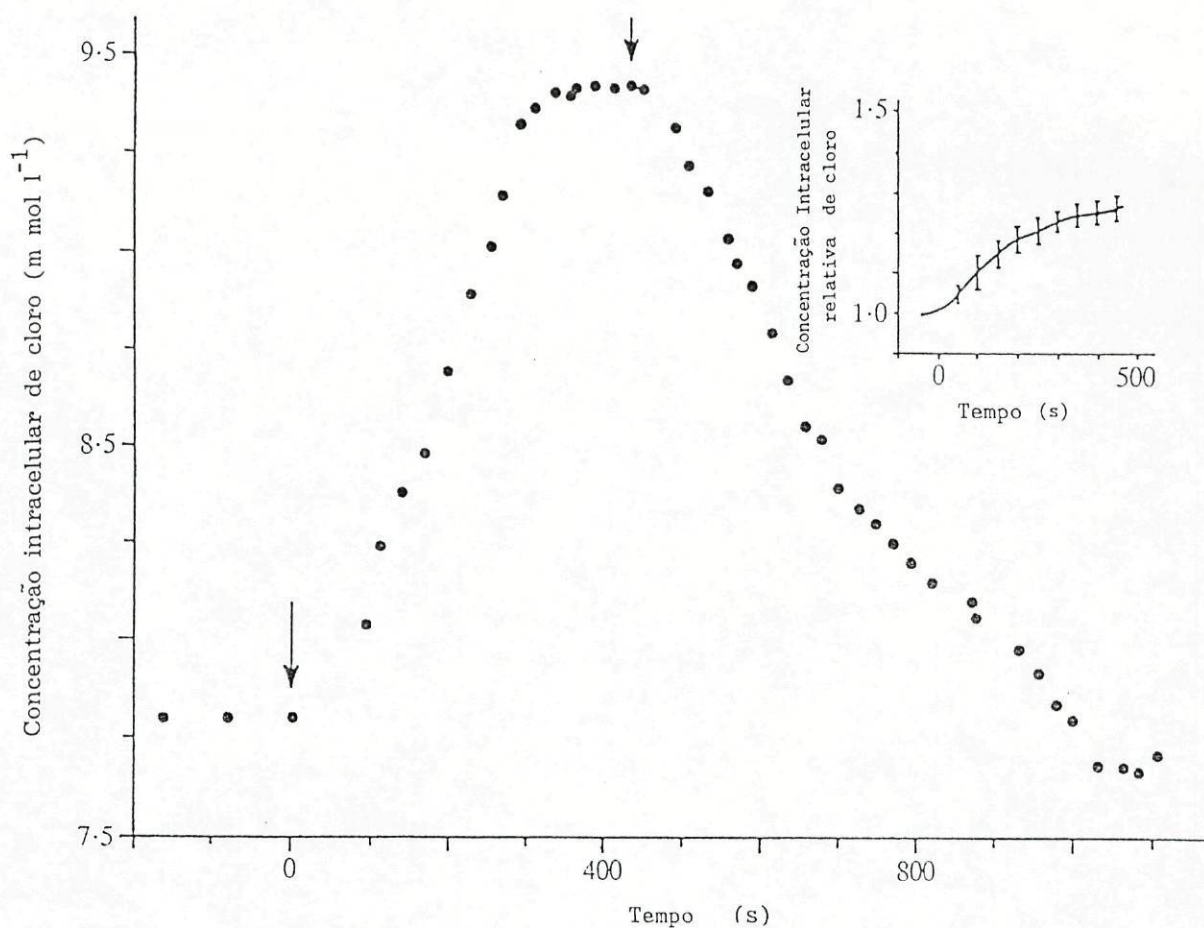


Fig. III.7 - Influência da presença bicarbonato na solução da hemolinfa sobre o cloro intracelular. A remoção de bicarbonato está indicada pela primeira seta e a reintrodução pela segunda seta. As concentrações intracelulares foram medidos com microelétrodos sensíveis a cloro. O painel inserido refere os resultados obtidos com quatro preparações. Para cada preparação o valor em cada tempo  $t$  foi dividido pelo valor no instante zero. Estão representadas as médias  $\pm$ EPM.

TABELA III.4. Influência do cálcio e do potássio sobre a corrente de curto circuito condutância epitelial, voltagem em circuito aberto e fluxos de cálcio unidirecionais.

N	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	I <sub>cc</sub>	g <sub>T</sub>	V <sub>ca</sub>
7	1	7	53.7 ±4.7	1.39 ±0.05	38.8 ±0.80
	6	7	49.7 ±4.0	2.06 ±0.08	24.3 ±2.10
7	1	7	53.3 ±5.1	1.34 ±0.05	40.1 ±4.20
	6	1	36.1 ±4.6	1.68 ±0.06	21.7 ±2.80
11	0	7	23.3 ±1.3	0.55 ±0.05	45.5 ±3.90
	6	7	18.0 ±1.4	1.75 ±0.05	16.0 ±1.40

Resultados de três grupos de experiências. N é o número de pares de mantos em cada de experiências. As concentrações de cálcio e potássio são em mmol l<sup>-1</sup>. I<sub>cc</sub> em  $\mu A\ cm^{-2}$ ; g<sub>T</sub> em mS.cm<sup>-2</sup>; V<sub>ca</sub> em milivolts.

Ca <sup>2+</sup>	N	Hemolinfa -----> Concha			Concha -----> Hemolinfa		
		J <sub>H-&gt;C</sub>	I <sub>cc</sub>	J <sub>H-&gt;C</sub> /I <sub>cc</sub>	J <sub>C-&gt;H</sub>	I <sub>cc</sub>	J <sub>C-&gt;H</sub> /I <sub>cc</sub>
1	4	0.32 ±0.12	6.08 ±0.81	0.051 ±0.02	0.32 ±0.03	6.05 ±0.51	0.052 ±0.002
6	4	0.32 ±0.10	3.56 ±0.51	0.092 ±0.03	0.49 ±0.19	3.25 ±0.25	0.156 ±0.002

Os fluxos de cálcio e as correntes de curto-circuito são expressos em mol. cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> .10<sup>10</sup>.

H->C fluxos unidireccionais do lado da hemolinfa para o lado da concha.

C->H fluxos unidireccionais do lado da concha para o lado da hemolinfa.

Quando além de se aumentar a concentração de cálcio se diminuiu a concentração de potássio de 7mM para 1 mM substituindo-o por colina, a corrente caiu 33%, a condutância aumentou 25% e o potencial caiu 47%. Pode-se ver a partir da Tabela III.4 que a alteração da concentração de cálcio nas soluções não afectou os fluxos líquidos de cálcio, os quais permaneceram desprezivelmente pequenos a altas e baixas concentrações de cálcio. O efeito do cálcio na corrente de curto-circuito deve-se provavelmente a alterações do transporte de outros iões. A Tabela III.4 mostra também que a preparação foi capaz de gerar uma corrente e um potencial em circuito aberto na ausência de cálcio.



### 3-Discussão

A formação e o crescimento da concha compreende pelo menos dois aspectos distintos mas interrelacionados: a produção de uma matriz orgânica constituída principalmente por proteínas e a deposição de carbonato de cálcio sob forma cristalina. A precipitação de carbonato de cálcio presente no líquido extrapaleal é determinada pelo facto das concentrações de cálcio e de carbonato neste líquido estarem acima do seu produto de solubilidade. A via de entrada mais provável destes iões para a cavidade extrapaleal é o EEM.

Istin e Metz (1964), Istin e Kirschner (1968) e Sorenson *et al.* (1980) mostraram que na ausência de gradientes de concentração iónica, o manto gera um potencial espontâneo "in vitro". A orientação deste potencial (lado da concha mais positivo) poderia indicar um transporte activo de cálcio em direcção ao líquido extrapaleal o que "in vivo" poderia arrastar bicarbonato em direcção ao mesmo compartimento como consequência do efeito do potencial eléctrico transepitelial. Esta hipótese é improvável uma vez que Istin e Metz (1964) demonstraram que os movimentos de cálcio através do manto são puramente difusionais, observação confirmada mais tarde por outros autores (Istin e Kirschner, 1968; Sorenson *et al.* 1980) e pelo presente trabalho.

#### 3.1-Natureza da corrente de curto-circuito

Este trabalho refere pela primeira vez os resultados obtidos com o epitélio extrapaleal do manto curto-circuitado e a Figura III.8 apresenta um sumário esquemático ilustrado das nossas



conclusões. As experiências em que o sódio, potássio ou o cloro foram removidas dos banhos indicam que esta corrente não é devida a um fluxo líquido de qualquer um destes iões. As mesmas experiências podem ser usadas para avaliar a contribuição do fluxo difusional dos três iões para a condutância transepitelial total. Apesar do sódio, potássio e do cloro corresponderem à maior parte do conteúdo iónico dos banhos, a sua contribuição para a condutância transepitelial é provavelmente menor do que 30% do total (cerca de 10% cada).

Para um processo difusional através de uma membrana e na ausência de um gradiente electroquímico o fluxo unidirectional ( $J_i$ ) de um ião ( $i$ ), medido com radio-isótopos, é dado por:

$$J_i = P_i \cdot C_i$$

onde  $P_i$  é a permeabilidade do epitélio para o ião  $i$  e  $C_i$  a concentração do ião  $i$  no lado "quente". Usando esta expressão e a partir dos fluxos referidos na Tabela III.2 podem calcular-se as permeabilidades epiteliais totais ao sódio, potássio, cloro, cálcio e bicarbonato. Se usarmos a média entre os dois fluxos unidireccionais os valores obtidos para cálcio, cloro e potássio são respectivamente:  $P_{Ca} = 3.5 \times 10^{-5}$ ,  $P_{Cl} = 3.3 \times 10^{-6}$  e  $P_K = 5.3 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ . A partir dos fluxos de sódio da hemolinfa para a concha obtem-se um  $P_{Na}$  de  $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ . Estes cálculos mostram que o EEM é quase dez vezes mais permeável ao cálcio que ao sódio, potássio ou cloro. Isto é provavelmente a razão da queda do potencial transepitelial e do aumento da condutância de membrana quando a concentração de cálcio em ambos os lados aumenta de 1 para 6 mM. Se extrapolarmos estas observações para a situação "in vivo", onde a concentração de cálcio é elevada



(6 mM ou mais elevada) na hemolinfa e no líquido extrapaleal, o potencial transepitelial será muito pequeno. A permeabilidade elevada ao cálcio poderia também explicar a razão pela qual a concentração de cálcio é tão semelhante na hemolinfa e no líquido extrapaleal (Tabela III.1 e de Waele, 1930).

Pode-se também mostrar que a condutância ( $g_i$ ) incremental de um ião (i) que se move através duma membrana por simples difusão quando este ião se encontra a um mesmo potencial electroquímico em ambos os lados da membrana é dado por:

$$g_i = [(z.F)^2 / R.T] . P_i . c_i = [(zF)^2 / RT] . J_i$$

onde F é o Faraday (96500 Coulombs/Eq), z é a valência (Eq/mol), R é a constante do gases perfeitos (8.315 J.deg<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>) e T a temperatura absoluta (293° K). Com esta expressão podem calcular-se as condutâncias para os diferentes iões. Obtem-se os seguintes valores:  $g_{Na}=0.17$ ,  $g_K=0.14$ ,  $g_{Cl}=0.26$  e  $g_{Ca}=0.52$  mS.cm<sup>-2</sup>. Somando as condutâncias de sódio, potássio, cloro e de cálcio obtem-se um valor de 1.09 mS.cm<sup>-2</sup> enquanto a condutância total da preparação medida electricamente anda entre 0.86 e 1.2 mS.cm<sup>-2</sup>. Por isso, a condutância devida a estes quatro iões corresponde praticamente à condutância total sendo a contribuição da condutância de cálcio 50% do total. A condutância do bicarbonato calculada a partir do fluxo de <sup>14</sup>C (da hemolinfa para a concha), admitindo que corresponde ao fluxo difusional de bicarbonato, é mais elevada (1.3 mS.cm<sup>-2</sup>) que a condutância total da preparação. Isto significa que o bicarbonato se move através da preparação em troca com outro anião, por exemplo cloro, ou que o fluxo do <sup>14</sup>C reflecte o movimento de CO<sub>2</sub> marcado. Esta última sugestão parece mais provável por duas razões: o DIDS inibe completamente a corrente de



curto-circuito sem afectar o fluxo de  $^{14}\text{C}$  da hemolinfa para a concha; os fluxos unidireccionais de cloro são muito pequenos.

Os únicos fluxos líquidos detectados com radioisótopos na ausência de gradientes electroquímicos foram os de sódio e de bicarbonato. O fluxo líquido de sódio em direcção à hemolinfa é tão pequeno que pode não ser detectável em experiências de substituição iónica (Fig. III.4). Os efeitos do DIDS e do Amiloride indicam que na geração da corrente de curto-circuito estão envolvidas trocas de bicarbonato/cloro (Boron, 1983; A em Fig. III.8) e de protão/sódio (Benos, 1982; B na Fig. III.8). A lentidão dos efeitos dos dois inibidores indica que a função dos mecanismos de troca é provavelmente a de manter gradientes iónicos, correspondendo a queda gradual da corrente à dissipação lenta destes gradientes.

### 3.2-Bomba de sódio

A insensibilidade da corrente de curto-circuito à ubaína não é uma prova absoluta que a bomba de sódio está ausente neste epitélio. A ATPase Na-K foi encontrada em fracções microsomais do manto de vários bivalves (Deaton, 1982). Os valores das concentrações intracelulares de sódio e de potássio referidos neste trabalho são consistentes com a sua presença no manto de *A. cygnea*. A concentração de sódio intracelular determinada pela fotometria de chama (12mM) é claramente inferior ao valor de equilíbrio admitindo um potencial de membrana de 31 mV. Dado que o potencial de membrana não foi medido simultaneamente, esta afirmação requer confirmação.

Em relação ao potássio fomos capazes de medir simultaneamente



os potenciais eléctricos e electroquímicos intracelulares e verificamos que o potássio está em equilíbrio ou ligeiramente acima do equilíbrio.

Apesar de não se ter encontrado um efeito da ubaína, sugerimos na Figura III.8(C) a presença da bomba de sódio na barreira basolateral dado que ela pode estabelecer uma recirculação para o sódio transportado pelo trocador sódio/protão (B).

### 3.3-Função do $\text{CO}_2$

A inibição da corrente de curto-circuito pelo diamox observada na Figura III.6 é uma indicação de que parte do transporte de bicarbonato depende do fornecimento deste ião pela hidratação catalisada de  $\text{CO}_2$  (Fig. III.8) que ocorre no interior das células. Quando as soluções externas são equilibradas com 5% de dióxido de carbono (cerca de 40 mm da pressão parcial de Hg) e admitindo uma solubilidade de cerca de 0.05 mmols/mm Hg a 20°C (Edsall e Wyman, 1958) a concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido nas soluções externas e na água citoplasmática é no máximo 2 mM. Se pensarmos que a espessura do epitélio é 15µm e que 70% do seu volume é ocupado por água intracelular haverá cerca de dois nanomoles de  $\text{CO}_2$  por  $\text{cm}^2$  de epitélio. À taxa de hidratação de  $0.038 \text{ sec}^{-1}$  (Maren, 1967) a taxa de produção máxima de ácido carbónico e de bicarbonato será de  $76 \text{ picomoles} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  de epitélio o que equivalerá a  $7.3 \text{ microamps} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Contudo, mediram-se correntes de curto-circuito acima de  $70 \text{ microamps} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Estes cálculos grosseiros da produção de bicarbonato, que correspondem provavelmente a sobrestimativas, mostram que nas nossas condições experimentais a hidratação não catalizada de dióxido de carbono

é incapaz de manter totalmente a corrente de curto-circuito medida.

Os mecanismos responsáveis pela corrente de curto-circuito parecem deste modo envolver a difusão de dióxido de carbono para o citoplasma (2 na Fig. III.8), sua hidratação catalizada pela anidrase carbónica e a extrusão de pelo menos parte do bicarbonato produzido intracelularmente para o compartimento da hemolinfa. Tais mecanismos explicariam o efeito do DIDS (3 na Fig. III.8) quando adicionado à solução da hemolinfa, o efeito do diamox (4 em Fig. III.8) e o aumento do cloro intracelular quando o bicarbonato é removido da solução da hemolinfa. Não se pode excluir que algum bicarbonato possa entrar na célula através da barreira apical.

A fim de regular o pH intracelular um número de protões igual ao número de bicarbonatos excretado tem de deixar a célula. O efeito do amiloride (5 na Fig. III.8) indica que uma fracção destes protões pode também ser excretada através da membrana basolateral por troca com sódio (B na Fig. III.8); os restantes são provavelmente excretados através da membrana apical (6 na Fig. III.8). Apesar da troca de cloro/bicarbonato ser electricamente silenciosa, pode-se originar um gradiente electroquímico para o cloro (entre o citoplasma e os compartimentos externos) que conduz a um efluxo difusional através da membrana basolateral (7 em Fig. III.8) que anulará o influxo destes iões originado pelo transportador de cloro/bicarbonato. O resultado final será um efluxo de bicarbonato em direcção à solução da hemolinfa e uma recirculação de cloro através da membrana basolateral. O potencial intracelular em curto-circuito é sensível à remoção de cloro



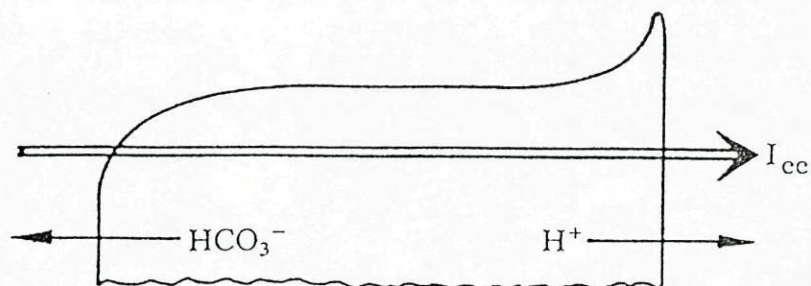
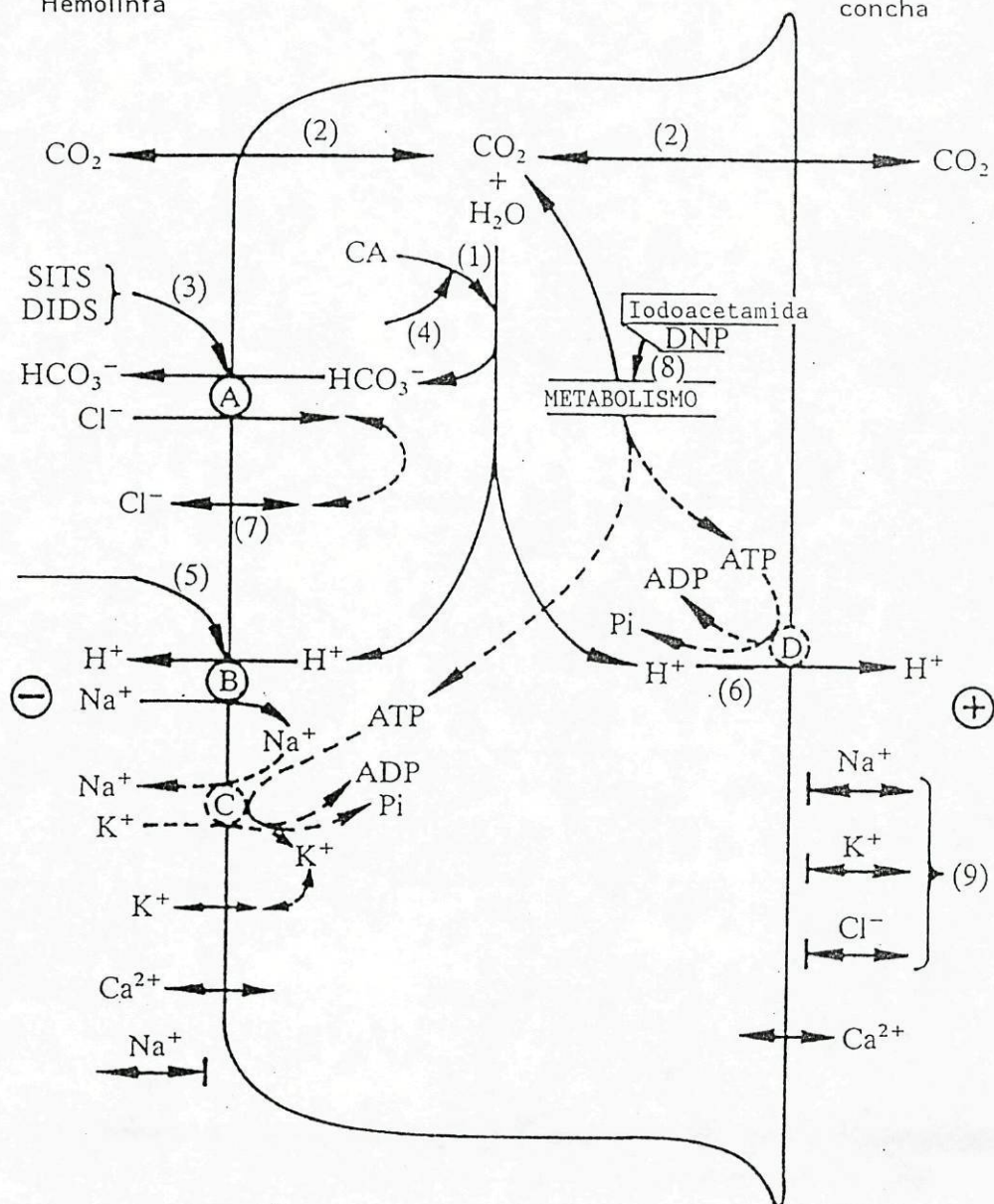
da solução da hemolinfa mas o efeito observado é uma hiperpolarização e não o oposto como se pode esperar de um efeito difusional. De todos os inibidores usados a iodocetamida e o DNP foram os que tiveram os efeitos mais dramáticos na corrente de curto-circuito. O efeito metabólico da iodocetamida, inibidor de grupos thiol (Dixon e Webb, 1964), não está totalmente caracterizado. Inibe quase completamente a glicólise e bloqueia também o sistema da triose fosfato desidrogenase causando uma baixa no nível de ATP intracelular (Pon, 1964). Deste modo o DNP (inicialmente) e a iodocetamida provocam um decréscimo na produção de ATP (8 na Fig. III.8). Se a queda na corrente de curto-circuito reflecte este efeito, isso indica uma estreita ligação entre a concentração de ATP intracelular e o transporte líquido de cargas através do epitélio. A bomba de sódio não é esta ligação uma vez que o efeito da ubaína foi muito pequeno e lento. Como se tinha concluído atrás, a extrusão de bicarbonato através da barreira basolateral implica uma extrusão de protões através da membrana apical. As experiências descritas no capítulo IV confirmam esta previsão. A corrente de curto-circuito foi insensível ao amiloride adicionado à solução da concha e o potencial intracelular não mudou quando o sódio, potássio ou o cloro foram removidos da mesma solução (9 na Fig. III.8). Isto sugere que não só a permeabilidade da membrana apical a estes iões é relativamente baixa mas, também que a extrusão de protões não é por troca de protão/sódio. Por outro lado quando se aumentou a concentração de protões na solução da concha houve uma inibição notória da corrente de curto-circuito (Fig. III.5). Estas considerações sugerem a possibilidade de uma bomba electrogénica de protões (D

Fig. III.8 - Electrofisiologia do epitélio extrapaleal do manto. A figura resume as observações fundamentais. A corrente de curto-circuito ( $I_{cc}$ ) é devida ao transporte de bicarbonato para o lado da hemolinfa e de prótons para o lado da concha (parte inferior da figura). Os prótons e bicarbonatos são gerados principalmente através da hidratação de  $CO_2$  catalizada pela anidrase carbónica (CA e 1) dado que grande parte da corrente é inibida pelo diamox (4). Quando o  $CO_2$  não está presente na mistura gasosa a corrente cai para valores muito baixos. Isto sugere que as principais fontes de  $CO_2$  são as soluções externas (2). O bicarbonato celular é transportado através da barreira basolateral por troca com cloro (A) e esta troca é bloqueada por SITS e DIDS (3). Há uma recirculação de cloro através da mesma barreira. Parte dos prótons gerados intracelularmente são excretados para a hemolinfa por troca com o sódio (B). Este processo é inibido pelo amiloride (5). É postulada uma bomba de sódio na barreira basolateral, o que possibilita a recirculação do sódio. O potássio transportado por esta bomba difunde para fora através da mesma barreira. É também postulada uma bomba electrogénica de prótons (D) na barreira apical. Os efeitos de DNP e de iodacetamida (8) podem ser atribuídos a uma queda da concentração de ATP intracelular. A permeabilidade da barreira apical ao sódio, potássio e cloro é muito pequena (9). A permeabilidade da barreira basolateral ao sódio é também muito pequena. Os valores do potencial eléctrico intracelular e das concentrações intracelulares de sódio, potássio e cloro são dadas na Tabela III.4.



Lado da  
Hemolinfa

Lado da  
concha



na Fig. III. 8) na barreira apical. Bombas electrogénicas de protões foram identificadas na bexiga da tartaruga marinha *Pseudemys scripta* (Steinmetz et al. 1967) e do sapo *Bufo marinus* (Ludens e Fanestil, 1972), nos tubos colectores do rim de mamíferos (Stoner et al. 1974) e na pele da rã (Ehrenfeld et al. 1985).

### 3.4-Função do manto na formação da concha

Apesar de os nossos resultados, assim como de outros autores já referidos, não nos elucidarem completamente sobre o papel do epitélio extrapaleal do manto na calcificação da concha, a hipótese de tal função existir é difícil de excluir.

Esta estrutura é altamente permeável ao cálcio e um ligeiro gradiente de cálcio (em direcção ao lado da concha) pode gerar um fluxo de cálcio líquido pequeno, mas suficiente, para o lado da concha. Se o comportamento "in vitro" do EEM reflecte o modo como funciona "in vivo", o papel da zona central do manto é o de evitar a calcificação da concha. O transporte de bicarbonatos para a hemolinfa, o potencial em circuito aberto e o transporte de protões para o fluido extrapaleal, opoem-se à criação de condições favoráveis à precipitação de bicarbonato de cálcio.

A calcificação da concha pode deste modo ser o resultado de um balanço entre os movimentos de cálcio através do EEM resultando de um gradiente electroquímico deste ião em direcção ao líquido extrapaleal, criado por processos que aumentam a sua concentração na hemolinfa, e o transporte de bicarbonatos e protões, metabolicamente dependente, o qual moverá cálcio na direcção oposta.

Por outro lado, como se verá mais adiante, a função do manto



deve ser modulada por outros factores dado que o crescimento da concha não é constante e o comportamento eléctrico do EEM varia ao longo do ano provavelmente acompanhando o ciclo reprodutivo.

#### 4-Sumário

4.1 - O epitélio extrapaleal do manto (EEM) de *A. cygnea* isolado e equilibrado com uma mistura gasosa contendo CO<sub>2</sub> e em condições de curto-circuito gerou uma corrente que exibiu variações cíclicas ao longo do ano.

4.2 - EM condições de curto-circuito o potencial intracelular ( $31 \pm 0.5$  mV, n=65) foi insensível a mudanças de concentrações de cloro, sódio ou potássio nas soluções que banham o lado da concha da preparação. Nas mesmas condições o potencial intracelular foi sensível a mudanças de concentrações de potássio ou cloro na solução da hemolinfa mas não a mudanças na concentração de sódio.

4.3 - Quando a preparação foi equilibrada com oxigénio puro a corrente caiu de  $85 \pm 1\%$  (n=8). Uma queda semelhante na corrente ( $88 \pm 2\%$  n=8) foi observada quando a solução que banha o lado apical do epitélio foi preparada sem bicarbonato e equilibrada com carbogénio. Quando esta mesma solução foi equilibrada apenas com oxigénio e ajustada a pH 7.2, a corrente caiu  $67 \pm 2\%$  (n=8) e quando ajustada a pH 4.5 caiu  $92 \pm 4\%$  (n=8).

4.4 - A corrente de curto-circuito foi inibida pelo DIDS (0.5 mM) e SITS (0.5 mM) quando estas drogas foram adicionadas do lado da

hemolinfa. A corrente foi também inibida pelo DNP (1 mM), iodoacetamida (1 mM) e diamox (1 mM). O amiloride (0.1 mM) bloqueou a corrente mas só do lado da hemolinfa. A ubaína (0.1 mM) não afectou a corrente.

4.5 - Os fluxos líquidos de rubídio (usado como marcador de potássio), cloro e cálcio, medido com  $^{86}\text{Rb}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  e  $^{45}\text{Ca}$ , respectivamente, foram muito pequenos quando comparados com a corrente de curto-circuito. Houve um pequeno fluxo líquido de sódio (medido com  $^{22}\text{Na}$ ) em direcção ao lado da hemolinfa. O fluxo líquido de bicarbonato (medido com  $^{14}\text{C}$ -bicarbonato) correspondeu a um fluxo de carga igual à corrente de curto-circuito e foi inibido por DIDS. A permeabilidade ao cálcio foi uma ordem de grandeza mais elevada que as permeabilidades ao sódio, potássio ou cloro.

4.6 - As concentrações intracelulares de potássio e cloro medidas com microelétrodos sensíveis a iões foram de  $26.5 \pm 1.1$  (n=16) e de  $7.9 \pm 0.3$  (n=30) mM, respectivamente. Quando estas concentrações foram medidas com métodos químicos os valores encontrados foram  $29.4 \pm 0.4$  (n=20) e  $12.9 \pm 0.6$  (n=20) mM respectivamente. A concentração intracelular de sódio medido quimicamente foi de  $14.0 \pm 0.6$  (n=20) mM. Quando os bicarbonatos foram removidos do lado da hemolinfa a concentração intracelular de cloro subiu.

4.7 - Os movimentos de cálcio através do EEM são por difusão simples e a calcificação da concha resulta provavelmente do balanço entre uma difusão de cálcio para o compartimento extrapaleal quando se cria um gradiente electroquímico favorável para



este ião e o movimento igualmente passivo de cálcio que resulta do transporte contra gradiente de iões bicarbonato realizados pelo epitélio. O balanço entre estes dois processos pode explicar as variações cíclicas ao longo do ano.

## CAPÍTULO IV

### BALANÇO ÁCIDO-BÁSICO

Como se verificou no Capítulo III em condições de curto-circuito o epitélio gera uma corrente ( $I_{cc}$ ) que quando expressa como um fluxo molecular tem a mesma grandeza do fluxo líquido de  $^{14}\text{C}$ -bicarbonato, do lado da concha para a hemolinfa, medido simultaneamente. O fluxo líquido de bicarbonato e a  $I_{cc}$  são igualmente inibidos por DIDS e SITS. A corrente é ainda inibida pela iodocetamida, parcialmente inibida pelo diamox e é muito sensível à concentração de  $\text{CO}_2$ . Dada a ausência de um fluxo líquido simultâneo de prótons em direcção à hemolinfa, haverá provavelmente uma acumulação de ácido (prótons) noutro compartimento. A composição do compartimento celular é seguramente controlado uma vez que a preparação tem a capacidade de manter uma  $I_{cc}$  estacionária por várias horas o que sugere haver a acidificação do líquido extrapáleal. Este mecanismo implica que, quando expressas nas mesmas unidades, a  $I_{cc}$  e o fluxo líquido de bicarbonatos e de prótons através das membranas respectivamente basolateral e apical têm a mesma grandeza. Os resultados apresentados neste Capítulo confirmam esta hipótese. Dentro do erro experimental os três valores são semelhantes numa variedade de condições.



## 1-Materiais e Métodos

O EEM foi dissecado, montado em câmaras de Ussing e continuamente curto-circuitado segundo o método já descrito no Capítulo I e III.

A maior parte das vezes a solução que banhava ambos os lados da preparação (solução control) tinha a seguinte composição: Na 11mM; K 7mM; Cl 19mM; Mg 0.5mM; Ca 1mM;  $\text{HCO}_3^-$  2mM. Em algumas experiências o lado da hemolinfa esteve em contacto com a solução control enquanto que se realizaram algumas substituições na solução do lado da concha. Quando o cloreto foi substituído por gluconato, isetionato, tiocianato ou sulfato a osmolalidade da solução foi compensada com a adição de sucrose. Estudou-se o efeito do pH sobre a corrente de curto-circuito substituindo 2 mM de  $\text{HCO}_3^-$  por 1 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  na solução da concha. Dado que se fizeram a maior parte das experiências na presença de  $\text{CO}_2$  exógeno não se utilizou o método "pH stat" (Sanders, Hayne e Rehm, 1973). A quantidade de ácido ou de base libertado para as respectivas soluções durante um período de 20-30 minutos foi medida por titulação duma quantidade conhecida da amostra de líquido extraído de cada meia câmara, sendo previamente equilibrada com azoto humificado, de modo a remover todo o  $\text{CO}_2$  dissolvido. O titulante (HCl) foi adicionado com uma seringa de precisão montada num micrómetro até que todo o bicarbonato fosse removido da solução. A Figura 1 mostra um registo da titulação duma amostra. Em condições de equilíbrio, com o azoto humidificado a borbulhar, a amostra tinha um pH cerca de 8. O início da titulação está indicado pela primeira seta. Por cada fracção de titulante

adicionado surge uma queda inicial de pH seguida de uma subida mais lenta. Este padrão resulta da lentidão na hidratação de  $\text{CO}_2$  e na desidratação de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . A fim de evitar excessos de titulante, este foi adicionado em quantidades progressivamente reduzidas. O final da titulação foi detectado (segunda seta) quando o pH permaneceu aproximadamente constante. A média e o erro padrão da média de 50 amostras de solução control contendo 2 mM de bicarbonato foram respectivamente  $2.03 \pm 0.002$  mM. Quando se utilizaram amostras com inibidores estes foram também incluídos em igual quantidade nos respectivos padrões. Os inibidores foram aplicados nas seguintes concentrações finais: amiloride 1mM; diamox 1mM; vanadato 1mM; DNP 1mM; DIDS 0.5 mM; oligomicina 200  $\mu\text{g/ml}$ ; diciclohexilcarbodiimide (DCCD) 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Para comparar a ICC com a taxa de alcalinização ou de acidificação dos respectivos compartimentos da hemolinfa e da concha, as quantidades de base ou de ácido libertadas pelo epitélio, medidos pelo método de titulação já descrito e expressas em  $\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , foram multiplicadas pelo Faraday ( $96.500 \text{ coul. eq}^{-1}$ ).

## 2-Resultados

Como foi dito na introdução seria de esperar que a quantidade de base transportada pela preparação para uma das meias câmaras fosse igual à quantidade de ácido libertado para a outra meia câmara. Isto é rigorosamente verdade em condições estacionárias quando nenhuma base ou ácido é acumulado nas células. Isto é, se a quantidade de bicarbonato libertado pela preparação para a



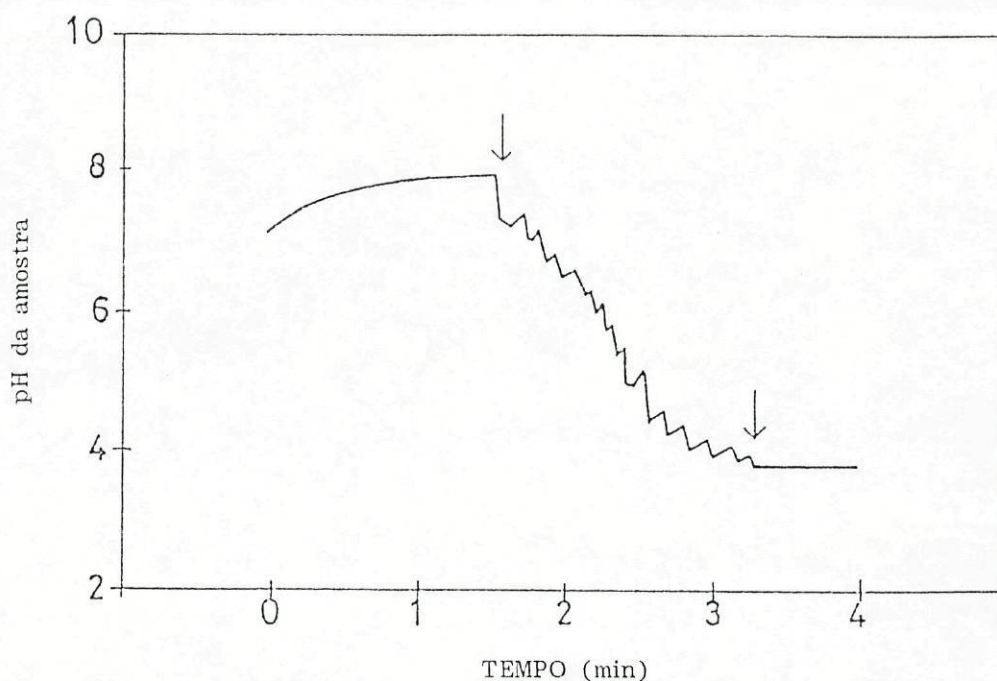


Fig. IV.1 - Titulação duma amostra. Eixo vertical - pH; Eixo horizontal - tempo; Primeira seta - início da titulação; segunda seta - fim da titulação. A amostra está em contínua agitação pelo borbulhar de azoto saturado de vapor de água desde o tempo zero até ao final.

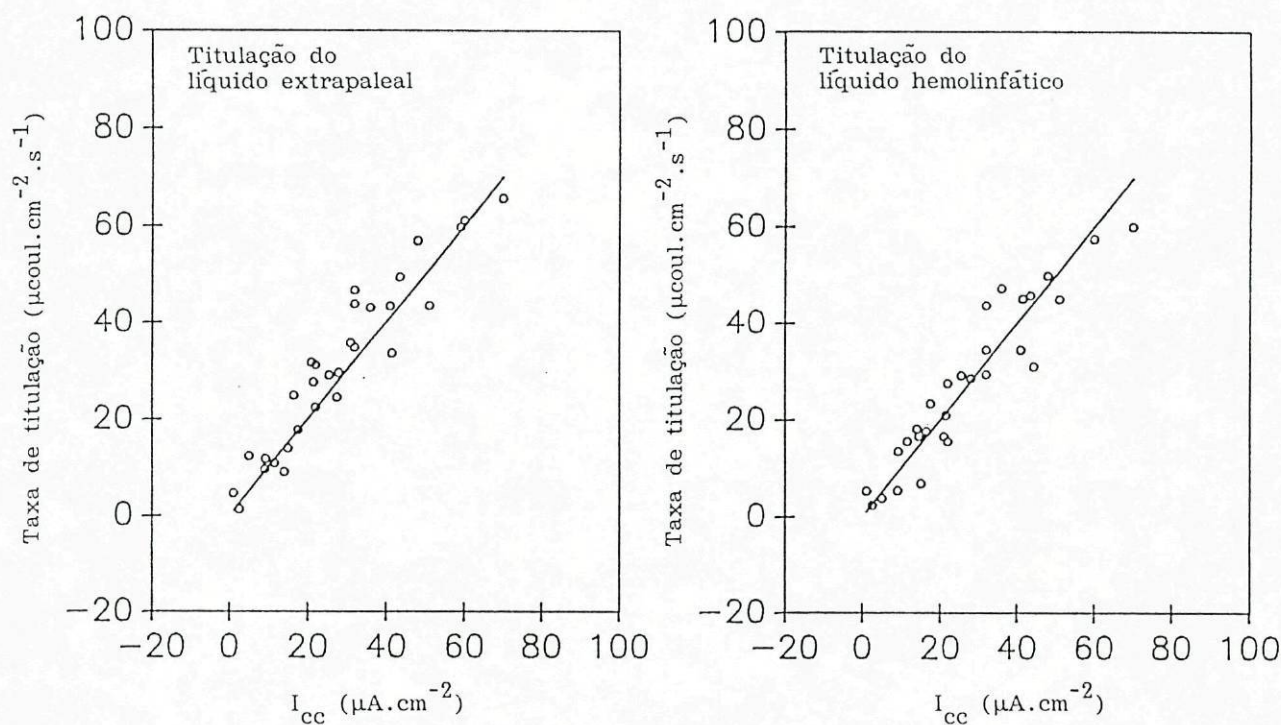


Fig. IV.2 - Relação entre a corrente de curto-circuito ( $I_{cc}$ ) e as taxas de titulação de ácido (painel da esquerda) e de base (painel da direita).

solução do lado da hemolinfa é igual à Icc quando expressas nas mesmas unidades (ver Capítulo III), então a quantidade de ácido transportado para a solução do lado da concha também será igual à Icc. Na Figura 2 estão representadas uma grande gama de taxas de titulações as Iccs correspondentes medidas em preparações em estado estacionário. As linhas contínuas representam uma inclinação da taxa de titulação/Icc de 1. Pode-se observar que os resultados experimentais estão de acordo com os previstos. Observações semelhantes foram referidas para a mucosa gástrica de anfíbios (Teorell, 1951) e para a bexiga urinária da tartaruga nos quais o transporte de sódio transepitelial foi bloqueado (Husted *et al.*, 1979).

Foi dito no Capítulo III que no EEP a corrente de curto-circuito é inibida por diamox, DIDS, DNP, amiloride e iodicetamida. A Figura 3 mostra que o diamox, DIDS e DNP induziram alterações nas taxas de secreção de base (lado da hemolinfa) e ácido (lado da concha) semelhantes às das correntes de curto-circuito registadas simultaneamente. O amiloride induziu uma diminuição nas quantidades de ácido e base secretadas e praticamente nenhum efeito na Icc durante o mesmo período. Isto está de acordo com a observação anterior (Capítulo III) onde a inibição de Icc pelo amiloride é muito lenta.

Estes resultados mostram que numa larga gama de taxas de transportes e dentro do erro experimental existe uma boa concordância entre Icc e o transporte líquido de ácido e base em condições de control e quando a preparação é inibida por diamox, DIDS ou DNP. Deste modo, uma corrente estável poderá ser usada para estimar o transporte de ácido no sentido do compartimento extra-



paleal e de base no sentido do compartimento da hemolinfa. A dependência de  $I_{cc}$  relativamente a  $O_2$  está representada na Figura 4. Em seis preparações depois de se atingir um estado estacionário em condições de control, três delas foram submetidas a uma mistura gasosa de  $N_2+CO_2$ . Os valores representados são as médias  $\pm$ EPM de  $I_{cc}$  dividido pelos valores correspondentes no tempo zero. Quando o azoto substituiu o oxigênio na mistura de gás a corrente caiu contínua e lentamente chegando a atingir um valor relativo de 0.5 depois de 30 minutos. O painel inserido refere-se a um grupo de experiências similares ( $n=6$ ) em que  $I_{cc}$  e as taxas de acidificação e alcalinização dos compartimentos da concha e da hemolinfa, respectivamente, foram medidas em simultâneo. Quer em condições de control (C, média de três períodos de 30 min. por cada preparação) quer em condições de anóxia (quatro períodos consecutivos de 30 min.) existiu uma razoável concordância entre as três quantidades.

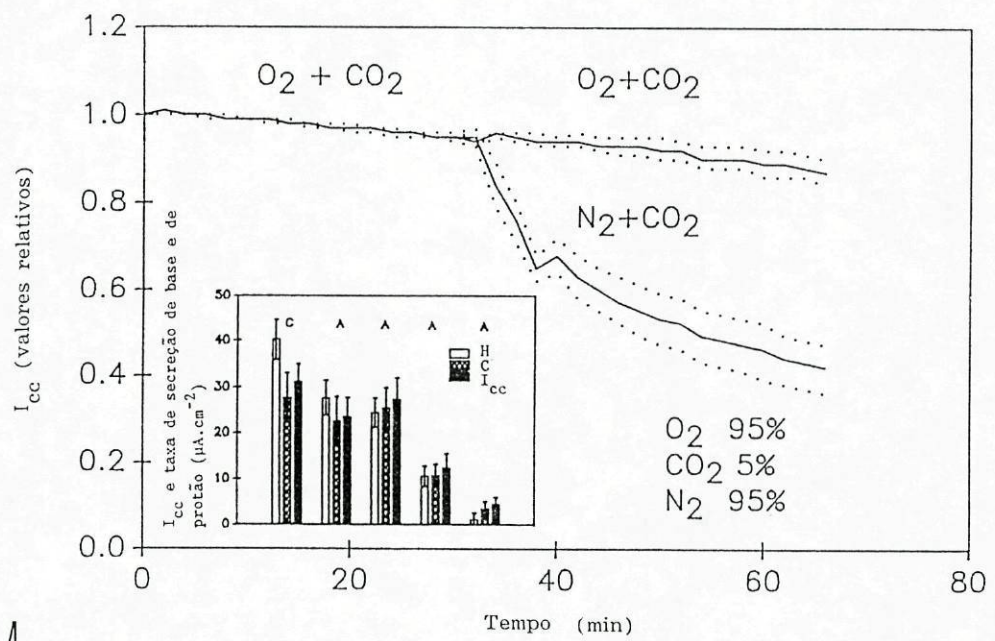
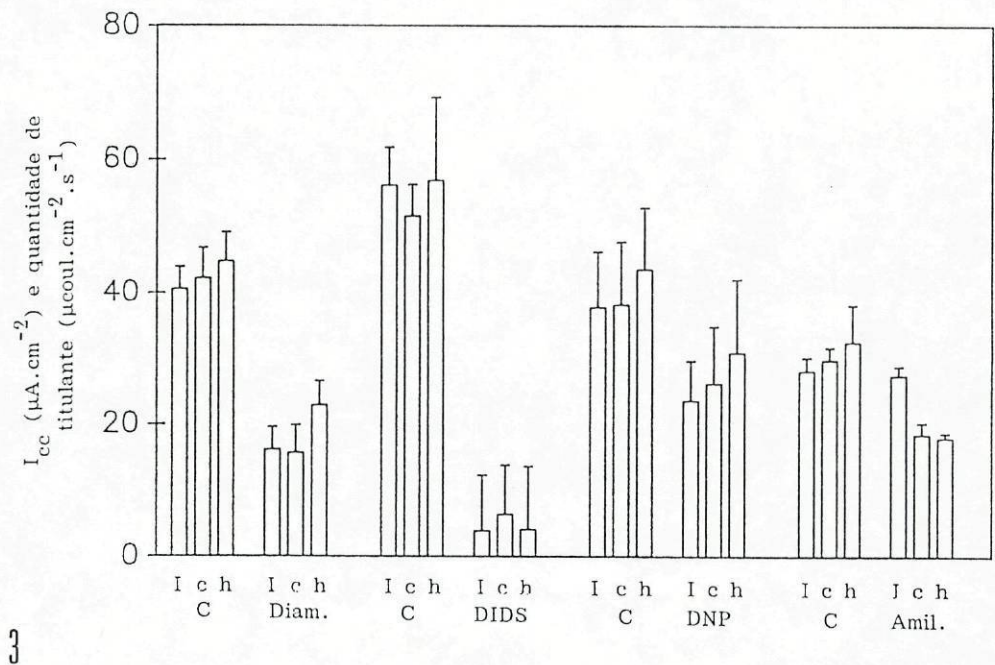
Quando o  $CO_2$  foi removido da mistura gasosa do lado da concha a  $I_{cc}$  caiu para 40% do valor control (Fig. 5). Nestas condições a  $I_{cc}$  foi quase insensível à concentração de bicarbonato no mesmo lado, no intervalo de concentrações entre 1.25 a 10mM. Quando a solução da concha foi nominalmente libertada de bicarbonato a  $I_{cc}$  caiu para um valor relativo de menos que 0.1. Contudo, um efeito de pH sobre  $I_{cc}$  não pôde ser analisado nestas experiências.

Num outro grupo de experiências (Fig. 6) estudou-se o efeito de pH da solução do lado da concha sobre  $I_{cc}$ . Esta solução contendo 1mM de  $H_2NaPO_4$  foi nominalmente libertada de bicarbonato e gazificada com oxigênio puro. Mediu-se a  $I_{cc}$  com o pH da solução do lado da concha ajustado com HCl a diferentes valores (9,

Fig. IV.3 - Efeito do diamox 1 mM (Diam.), DIDS 0.5 mM, DNP 1 mM e amiloride 1 mM (Amil.) sobre a corrente de curto-circuito (I), a taxa de secreção de ácido para o lado da concha (c) e sobre a taxa de secreção de base para o lado da hemolinfa (h). Período de control (C). Seis experiências por cada condição.

Fig. IV.4 - Dependência de Icc relativamente ao oxigénio. Seis preparações do EEP isoladas a partir de seis mantos foram montadas borbulhando as soluções com carbogénio (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>). Depois de um período de control, três destas preparações foram submetidas a uma mistura de N<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>. As linhas contínuas correspondem às médias das correntes instantâneas divididas pelas correntes correspondentes no tempo zero. As linhas pontuadas correspondem ao erro padrão das médias (EPM). Painel inserido: Icc e taxas de titulação de ácido e base medidas num outro grupo de seis preparações. C: médias ± EPM de três períodos iniciais de control durante 30 min. em seis preparações. A: médias ± EPM de períodos de 30 min. sob anóxia.





8, 7, 6, 5). A Figura 6 mostra que Icc é sensível ao pH em particular a pH's abaixo de 7.

Icc foi insensível a vanadato (1 mM) adicionado a ambos os lados (mudou de  $55.6 \pm 4.37$  para  $62.0 \pm 1.84 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  respectivamente,  $n=6$ ) à oligomicina ( $200 \pm \text{g/ml}$ ) também adicionado a ambos os lados (mudou de  $42.0 \pm 12.4$  para  $39.3 \pm 12.6$  respectivamente,  $n=6$ ). O DCCD ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) causou uma lenta e moderada inibição em anóxia quando adicionado à solução da concha e foi ineficaz na solução da hemolinfa (Fig. 7). O TBTO foi ineficaz na solução do lado da hemolinfa, mas inibiu quase completamente a Icc em menos de 10 segundos, quando adicionado à solução do lado da concha entre 10 a 100 nM, provocando também uma redução de 40% na condutância transepitelial. Tal efeito foi observado quando o principal anião na solução foi isetionato, gluconato, sulfato, tiocianato ou cloreto (Fig. 8).

### 3-Discussão

Tendo em conta os resultados já referidos anteriormente (Capítulo III) a corrente de curto-circuito do EEP nas nossas condições experimentais não pode ser atribuída ao fluxo líquido de cloro, potássio ou cálcio e ao pequeno fluxo líquido de sódio medido em direcção oposta. Neste capítulo mostramos que, em condições de curto-circuito, as taxas de acumulação de ácido na solução do lado da concha e de base na solução do lado da hemolinfa são numericamente iguais à Icc, quando expressas nas mesmas unidades. Estas observações são consistentes com o facto, previamente referido, de que o fluxo de  $^{14}\text{C}$ -bicarbonato em direcção ao



Fig. IV.5 - Dependência de Icc em relação às concentrações de bicarbonato estudada em seis preparações. Durante os períodos inicial e final as preparações foram banhadas em solução control borbulhadas com carbogênio de ambos os lados. Nos períodos intermediários a solução do lado da concha continha respectivamente 10, 5, 2.5, 1.25 e 0 de bicarbonatos e era borbulhada com oxigênio puro. O bicarbonato foi substituído por cloro.

Fig. IV.6 - Dependência de Icc relativamente ao pH do lado da concha estudada em seis preparações. Depois de um período inicial de control a solução do lado da concha foi substituída sucessivamente por outras soluções sem bicarbonato contendo 1 mM de  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  e ajustada a pHs 9, 8, 7, 6, 5 e 9 e gazificadas com  $\text{O}_2$  a 100%.

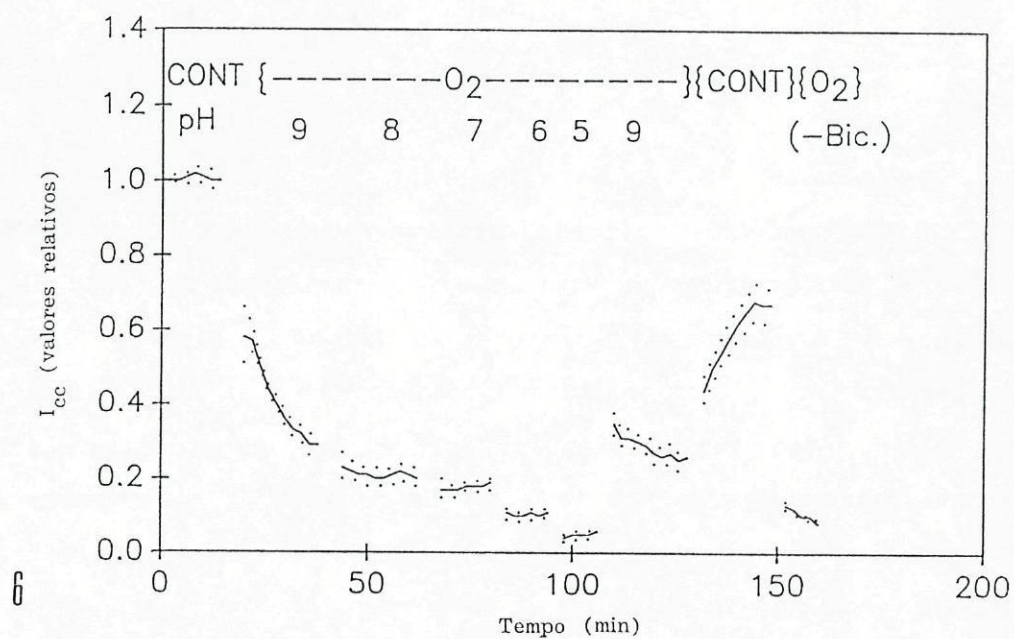
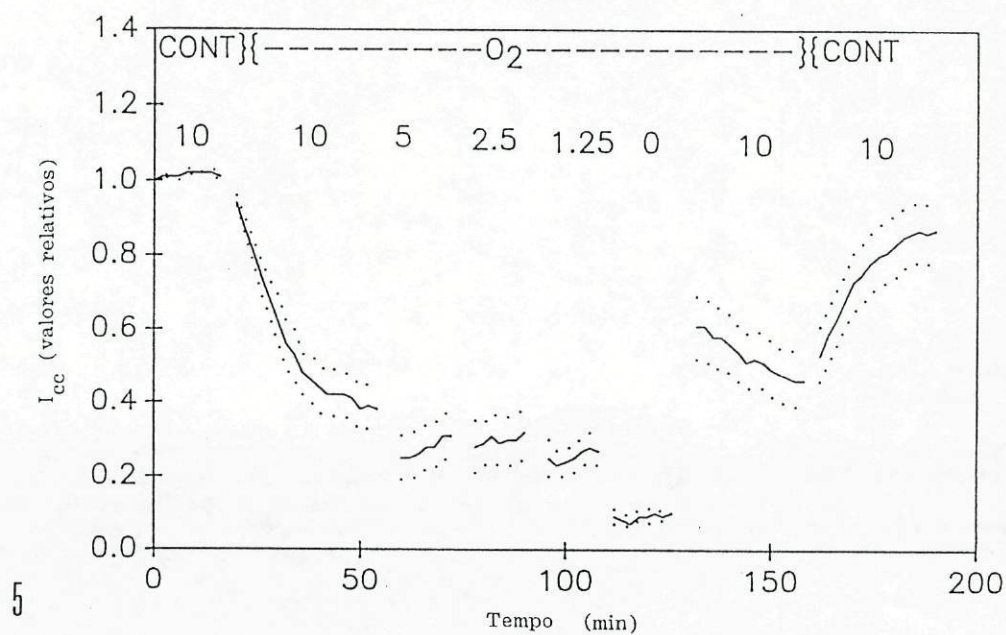
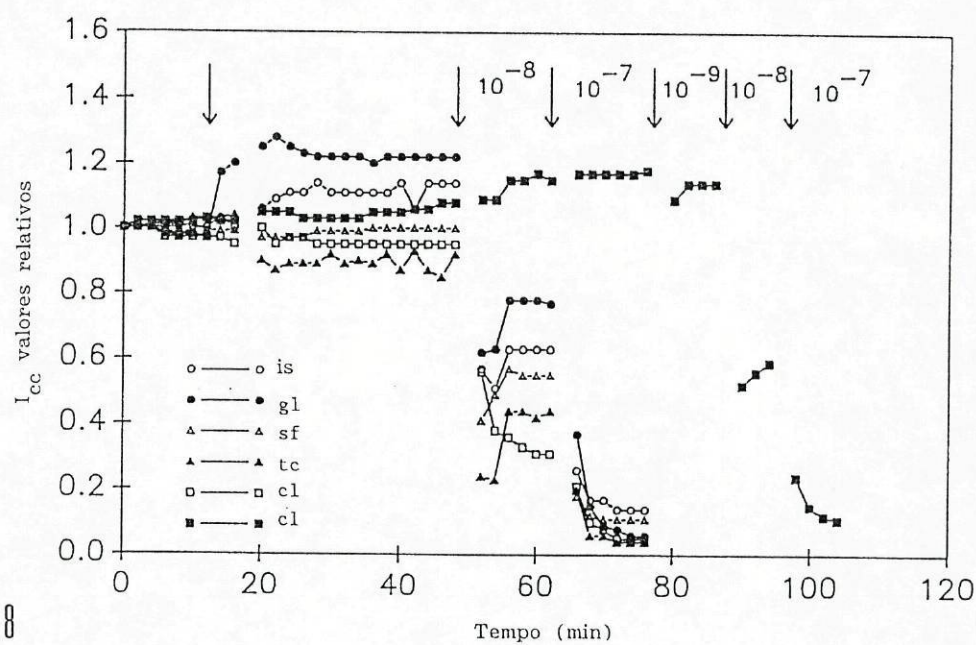
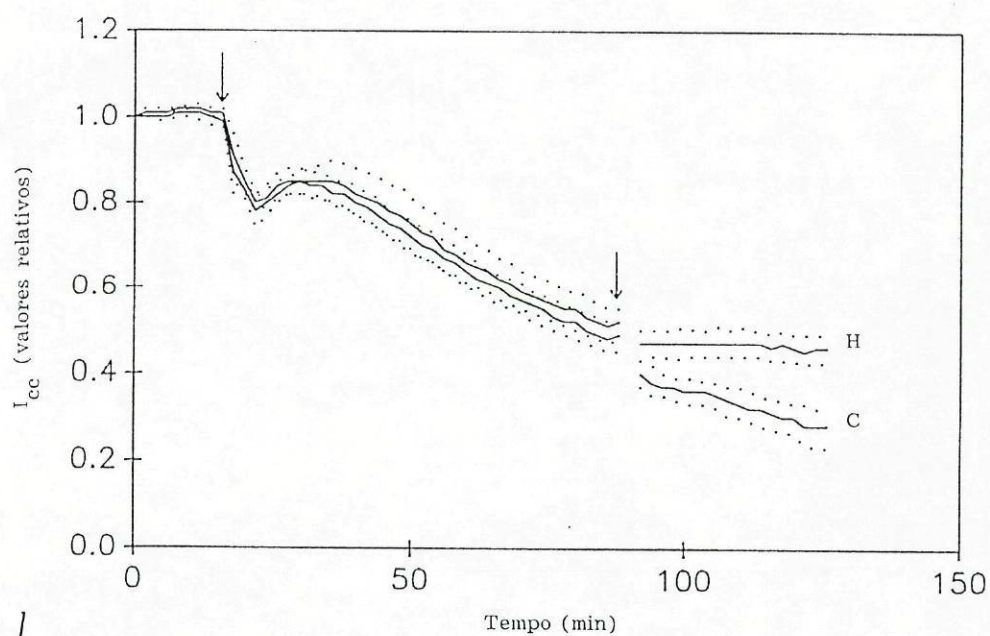




Fig. IV.7 - Efeito de DCCD sobre a Icc estudado em doze preparações. A partir da primeira seta até ao final as soluções foram borbulhadas com 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. No tempo indicado pela segunda seta adicionou-se DCCD (50 µg/ml) no lado da hemolinfa (H) de seis preparações e no lado da concha (C) de outra seis preparações.

Fig. IV.8 - Dependência aniônica relativamente ao efeito de TBTO sobre Icc estudada em seis preparações (uma para cada condição). No tempo indicado pela primeira seta o cloro (cl) foi substituído por isetionato (is), gluconato (gl), sulfato (sf) e tiocianato (tc) respectivamente. Depois de um período de 30 minutos 5 destas preparações (is, gl, sf, tc, cl) foram tratadas no lado da concha sucessivamente com 10 e 100 mM de TBTO. A sexta preparação (cl), que tinha sido conservada como um control, foi então tratada também do lado da concha com 1 nM, 10 nM e 100 nM de TBTO.





compartimento da hemolinfa é também igual à Icc.

A Icc e as taxas de libertação de ácido e de base pelo epitélio são de um modo idêntico oxigénio-dependentes e as drogas tais como iodoacetamida e DNP, que inibem a taxa de produção de ATP, são inibidores potentes de Icc.

Os movimentos do ião hidrogénio são difíceis de caracterizar. Primeiro, porque a maior parte das vezes a secreção de protões não se pode distinguir da entrada do ião hidroxilo, ou em muitos casos, da entrada do bicarbonato. Segundo, porque a concentração de protões pode, ao afectar o grau de ionização de proteínas, modificar a permeabilidade da membrana aos protões e alguns sistemas de transportes, em particular os responsáveis pela regulação do pH intracelular (Vaughan-Jones, 1988). Uma complicação posterior é o facto de que os movimentos de protões podem ser modulados pelo pH intracelular (Boron, 1986), potencial de membrana, hormonas, factores de crescimento e alterações osmóticas (Grinstein e Rothstein, 1986). No EEP a relação estreita entre Icc, acidificação e alcalinização das soluções de banho, juntamente com a sensibilidade destes processos ao diamox sugere o envolvimento do bicarbonato em qualquer fase. Três mecanismos alternativos podem explicar as nossas observações: Um transporte transepitelial de ácido ou simplesmente de protões em direcção à ao lado da concha, um transporte transepitelial de base (bicarbonato?) na direcção oposta ou extrusão simultânea de base através da membrana basolateral e de protões através da membrana apical. Dado que o fluxo líquido de  $^{14}\text{C}$ -bicarbonato, Isc e as taxas de alcalinização e acidificação das soluções de banho são sensíveis a SITS e DIDS actuando do lado da hemolinfa, uma



extrusão de bicarbonatos para a hemolinfa em troca com o cloro (Boron, 1983) parece estar presente. Tal processo explica porque razão o cloreto intracelular aumenta quando o lado basolateral é banhado por uma solução sem bicarbonatos (Capítulo III) e requer uma recirculação de cloro através da membrana basolateral. A baixa sensibilidade da Icc à substituição de cloro no lado da hemolinfa pode ser devida a uma alta afinidade do trocador aniónico para o cloro como se observou na bexiga urinária de tartaruga (Fisher *et al.*, 1983).

A sensibilidade de Icc às concentrações de bicarbonato e de  $\text{CO}_2$  no lado da concha sugere que a absorção de bicarbonato através da membrana apical pode ser parte do processo responsável por Icc. Contudo, quando o lado da concha é banhado por uma solução nominalmente livre de  $\text{CO}_2$  e de bicarbonato e ajustado a um pH de 7.2, correntes da ordem de  $6 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$  são ainda medidas.

Alternativamente, os protões podem ser transportados através da barreira apical em direcção à concha. Esta translocação pode ocorrer por um ou mais mecanismos tais como um antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , uma bomba  $\text{K}^+/\text{H}^+$  ou uma bomba electrogénica (Steinmetz e Andersen, 1982). O antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  foi identificado num grande número de sistemas celulares a partir de vertebrados e invertebrados e em particular em epitélios (Grinstein e Rothstein, 1986). A Icc através do EEP foi sensível ao amiloride actuando no lado basolateral, mas como a inibição era muito lenta e como a substituição de sódio por colina na solução do mesmo lado tivesse um efeito lento na Icc (Capítulo III) a contribuição deste antiporte, caso exista nesta preparação a excreção de protões através da barreira basolateral, é provavelmente pequena. A Icc foi insensível a



SITS, DIDS ou amiloride quando adicionado do lado da concha ou à substituição de sódio ou de potássio no mesmo banho (Capítulo III). Deste modo, será pouco provável que a secreção de ácido para o lado da concha seja devido ao antiporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , à bomba de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  ou à entrada de bicarbonato através da membrana apical envolvendo um cotransporte de  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  (Boron, 1986) e uma recirculação de bicarbonato através da mesma barreira. Além disso, dado que a resistência da barreira apical é 4 a 10 vezes a da barreira basolateral e é insensível à substituição de sódio, potássio e cloro por iões impermeáveis no lado da concha, é pouco provável que haja uma associação directa ou através do campo eléctrico entre os fluxos de protões e os fluxos de iões de sódio, potássio ou cloro através da barreira apical (Capítulo III). Além disso a Icc é rápida e intensamente inibida por DNP e por iodocetamida, drogas que afectam a taxa de produção de ATP. Sugerimos que a secreção de ácido em direcção ao compartimento extrapaleal é, pelo menos em parte, devido à operação de uma bomba electrogénica. A sua localização na barreira apical é idêntica à que se observa na bexiga urinária da tartaruga (Steinmetz e Andersen, 1982).

Não existe nenhum inibidor específico da bomba electrogénica de protões presente em epitélios. Contudo, a inibição de Isc por DCCD (em condições de anóxia) e por TBTO do lado da concha sugere a presença de uma bomba de protões (Goffeau e Boutry, 1986) e a velocidade do efeito de TBTO conjuntamente com a redução da condutância transepitelial indica que ele inibe um processo electrogénico por bloqueio de um canal condutor mais do que pela criação duma troca aniónica electricamente silenciosa (Linnet e

Beechey, 1979). Como seria de esperar, foi ainda observado a sensibilidade da bomba de prótons às variações de pH da solução do lado da concha. Uma posterior caracterização deste sistema exige medições de pH intracelular em várias condições.

#### 4-Sumário

4.1 - Em condições de curto-circuito o EEP de *A. cygnea* produz a acidificação da solução do lado da concha e a alcalinização da solução do lado da hemolinfa.

4.2 - As taxas de secreção de ácido e de base foram numericamente iguais à respectiva corrente de curto-circuito quando expressas nas mesmas unidades e em condições estacionárias.

4.3 - A anóxia, o Diamox, o DIDS (do lado da hemolinfa), o DNP e a iodicetamida inibiram de modo idêntico a corrente de curto-circuito e a secreção de ácido e base.

4.4 - A corrente de curto-circuito foi sensível às concentrações de  $\text{CO}_2$ , bicarbonato e prótons na solução do lado da concha.

4.5 - A corrente de curto-circuito foi insensível a vanadato e oligomicina, foi lentamente inibida por DCCD em anóxia e quase completamente inibido em poucos segundos por TBTO com uma redução de 40% na condutância transepitelial quando adicionados ao lado da concha.



4.6 - Sugere-se que a Icc seja devida a uma troca de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  com recirculação de  $\text{Cl}^-$  através da membrana basolateral e à operação duma bomba electrogénica de protões localizada na membrana apical.

## CAPÍTULO V

### ACTIVAÇÃO DA CORRENTE DE CURTO-CIRCUITO

Como vimos no Capítulo III o EEM de *A. cygnea* gera uma corrente, em condições de curto-circuito, correspondente ao fluxo líquido de bicarbonato em direcção à hemolinfa, que é bloqueada por iodocetamida, DNP, SITS e DIDS. Quando os animais são estudados ao longo do ano as correntes e os potenciais medidos apresentam variações cíclicas. Os valores mais altos são obtidos em Novembro e os mais baixos em Março.

Estas variações podem ser devidas quer a mudanças na capacidade dos sistemas de transporte responsáveis pela geração da corrente, quer a flutuações na disponibilidade de substratos, nomeadamente de ATP, como resultado de modificações sasonais das condições do meio ambiente.

Muitos moluscos, especialmente bivalves, vivem em habitats onde a concentração de oxigénio é baixa ou está sujeita a grandes flutuações durante o ano. Gade *et al.*, (1975) e Holwerda e Veenhof (1984) mostraram que *A. cygnea*, em condições de anaerobiose, produz inicialmente uma pequena acumulação de L-lactato e de alanina. Depois de uma anóxia prolongada a taxa de formação destes produtos não aumenta, a concentração de L-lactato pode mesmo cair ligeiramente, mas há uma grande produção de ácidos gordos voláteis e uma acumulação de succinato. Estas observações sugerem a existência de uma gradual acumulação de succinato durante as estações em que a hipoxia relativa é mais pronunciada



(primavera e verão) como resultado das temperaturas mais elevadas e do decréscimo da corrente local de água, conduzindo este último a uma redução do arejamento no meio em que o animal vive.

Com o objectivo de relacionar as variações de corrente de curto-circuito com as eventuais variações do aporte de succinato, estudou-se o efeito deste composto na corrente de curto-circuito. Outros substratos metabólicos foram também adicionados às soluções externas para observar o seu efeito na corrente.

### 1-Materiais e Métodos

Os pormenores relativos à obtenção e conservação dos animais (*A. cygnea*), ao isolamento do EEM e às técnicas utilizadas no seu estudo electrofisiológico foram já descritos no Capítulo III. Estudou-se o efeito de alguns substratos (Succinato, fumarato, malato, citrato, e  $\alpha$ -cetoglutarato) usando um processo que consiste nos três passos seguintes. A preparação foi primeiramente incubada em solução control. Quando as correntes e as voltagens estabilizaram a câmara do lado da hemolinfa foi esvaziada e cheia com solução idêntica à solução control mas com o bicarbonato de sódio (10mM) substituído por um sal de sódio do substrato (succinato de sódio, por exemplo) e ajustado a pH 4 com HCl 1N (solução I). Depois de um período de 15 a 20 minutos, durante o qual ocorre um aumento inicial de corrente, as câmaras foram esvaziadas e cheias de novo, quer com solução control, quer com uma solução idêntica mas com o NaCl substituído pelo sal de sódio do mesmo substrato (Solução II). O pH desta solução, em equilíbrio com carbogénio, era de 7.2. Este processo induziu um aumento na

corrente que estabilizou após cerca de 60 minutos. O efeito só se observou quando a experiência decorreu a 20°C, não se obtendo efeito a 15°C. Nos períodos do ano em que a temperatura ambiente é baixa convém ambientar os animais, 24 horas antes, à temperatura de 20°C. Com o objectivo de verificar se o efeito do substrato podia ser obtido a partir do lado da concha, um protocolo semelhante ao descrito acima foi seguido, mas em que a substituição pela solução I foi realizada no lado da concha.

Como inibidores metabólicos, utilizaram-se a iodocetamida o dinitrofenol (DNP) e o Diamox a uma concentração final de 1mM.

## 2-Resultados

A Figura V.1A mostra os resultados obtidos em dezoito mantos estudados na época da primavera. O epitélio foi inicialmente banhado por solução control até se obter uma corrente estável. Para cada manto os valores das correntes foram expressos como quocientes dos valores em qualquer instante a dividir pelos valores no tempo zero. Calculou-se então a média dos rácios das dezoito experiências em tempos idênticos e determinaram-se os erros padrões da média (EPM). Os valores das médias e os EPM foram simultaneamente representados em função do tempo na Figura V.1A. A primeira seta indica o início do período durante o qual o lado da hemolinfa da preparação foi banhado com solução I. Houve uma queda inicial da corrente seguida de um aumento gradual. Na altura indicada pela segunda seta ambas as câmaras foram esvaziadas e novamente cheias com solução II. A corrente continuou a subir até atingir um valor médio que era cinco vezes



o valor médio do período control. A média dos valores absolutos durante o período de control foi  $10.6 \pm 1.85 \mu\text{A cm}^{-2}$  ( $n=18$ ) enquanto depois duma activação completa pelo succinato ela foi de  $58.2 \pm 4.15 \mu\text{A cm}^{-2}$ . As condutâncias aumentaram de  $0.81 \pm 0.05$  para  $1.2 \pm 0.05 \text{ mS cm}^{-2}$ .

A activação pôde ser levada a cabo pela incubação da preparação com substrato do lado da concha. Encheu-se a câmara do lado da concha com solução I no tempo indicado pela primeira seta na Figura V.1B. A queda intensa de corrente observada nestas condições foi devida ao efeito da baixa de pH e da remoção de bicarbonatos, descrito previamente (Capítulo III). O resto do processo foi idêntico ao da Figura V.1A havendo um aumento de corrente mais pequeno.

A gravura inserida na Figura V.1A mostra a diferença de resultados obtidos quando na altura indicada pela segunda seta na Figura V.1A se encheu a câmara no lado da hemolinfa com solução II (barra sombreada) ou solução control (barra não sombreada). Pode-se ver que o aumento de corrente obtido com solução control na terceira fase é apenas 15% mais pequeno.

Na Figura V.2A estão representadas as médias das correntes e condutâncias antes e depois da activação completa obtida durante as diferentes estações do ano. O aumento da condutância provocado pela activação foi maior em Fevereiro e Maio mas as condutâncias do control foram mais elevadas em Agosto e Outubro. Apesar das correntes mais elevadas depois da activação serem obtidas em Agosto e Outubro os valores de control foram também mais elevados nestes meses. Deste modo, os aumentos provocados pela activação foram muito semelhantes ao longo do ano.

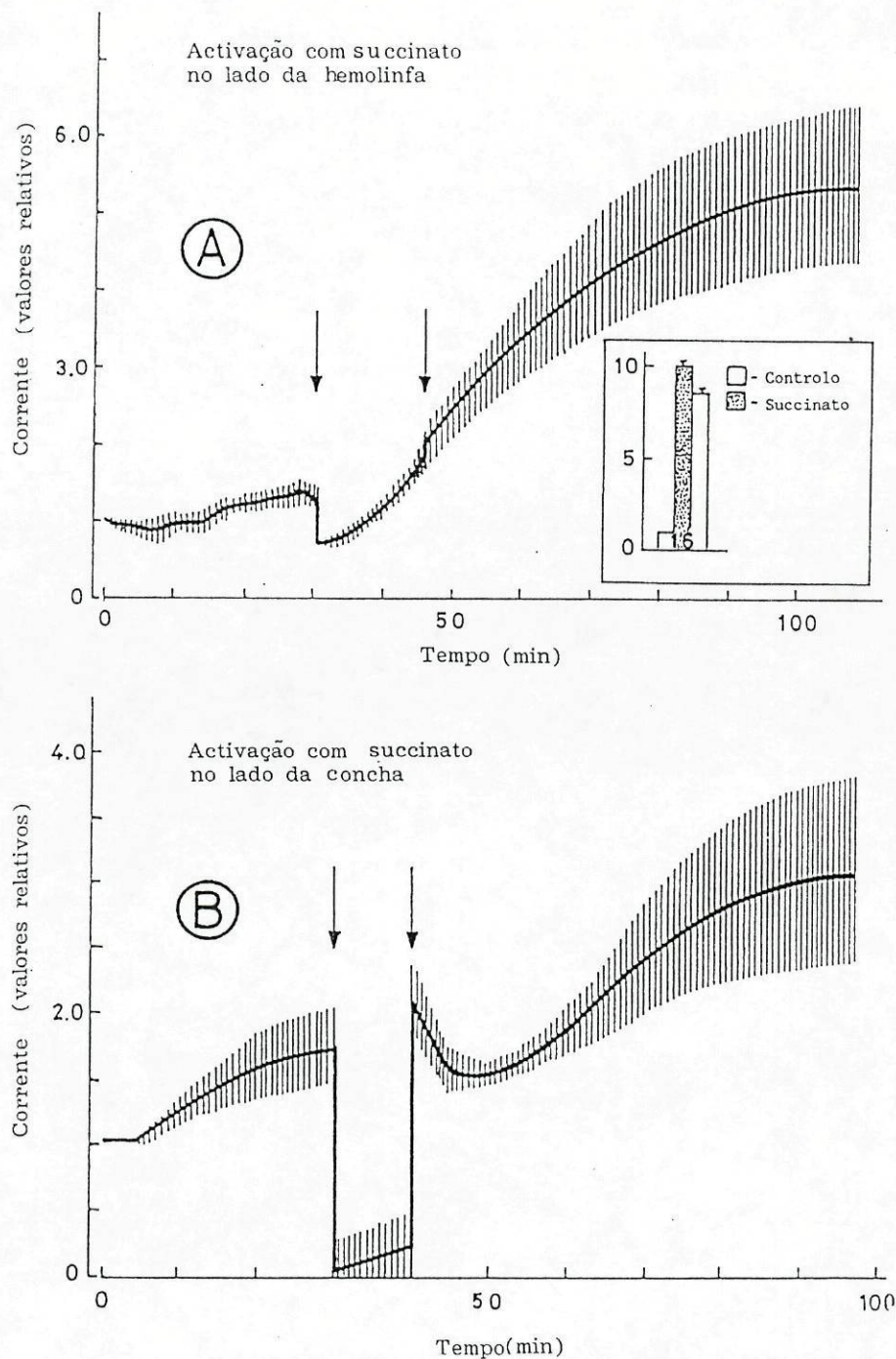


Fig. V.1 - Estimulação da corrente de curto-circuito do EEM pelo succinato. A preparação foi montada e banhada pela solução control de ambos os lados (fase 1). No tempo indicado pela primeira seta a câmara do lado da hemolinfa (painel A) ou do lado da concha (painel B) foi esvaziada e novamente cheia com a solução 1 (fase 2). No tempo indicado pela segunda seta ambas as câmaras foram esvaziadas e cheias novamente com solução II (fase 3). As linhas contínuas correspondem às médias ( $n=18$ ) dos quocientes entre a corrente em cada instante  $t$  e no instante zero. A área sombreada corresponde ao  $\pm$  EPM. Gravura inserida no painel A: num grupo de dezasseis experiências (barra não sombreada à direita) utilizou-se na fase 3 solução control em vez de solução II.



A Figura V.2B descreve os resultados obtidos com experiências realizadas na época de inverno usando succinato como substrato e serve para mostrar que só quando é seguido o protocolo acima descrito (Materiais e Métodos) é que a activação é completa. A primeira barra a partir da esquerda corresponde ao processo descrito nos métodos. A segunda barra mostra que a activação não se efectua a 15°C. A terceira barra corresponde a um processo de activação em que a segunda fase de activação com succinato a pH 4 no lado da hemolinfa foi suprimida. O processo de activação é também ineficaz. Nas experiências representadas pela quarta barra a solução control foi usada nas três fases do processo consistindo num período control seguido de um período durante o qual a solução do lado da hemolinfa era solução control a pH 4, finalmente seguida de um período em que a preparação foi de novo banhada de ambos os lados pela solução control a pH 7.2. Os efeitos nas condutâncias estão representados pelas barras 1-4 da direita. A Figura V.2C mostra a activação pelos diferentes substratos usados em experiências que se realizaram na época da primavera. Os valores representados são as médias e os EPMS das diferenças entre as correntes (ou condutâncias) medidas depois da activação completa e os valores de control correspondentes. Todos os substratos usados induziram aumentos idênticos de corrente. O  $\alpha$ -cetoglutarato produziu o maior efeito na condutância.

Na Figura V.3 estão representadas curvas semilogarítmicas do aumento de corrente em função do tempo, durante a terceira fase do processo de activação, mostrando que apesar dos cinco substratos produzirem estimulações semelhantes depois da activa-

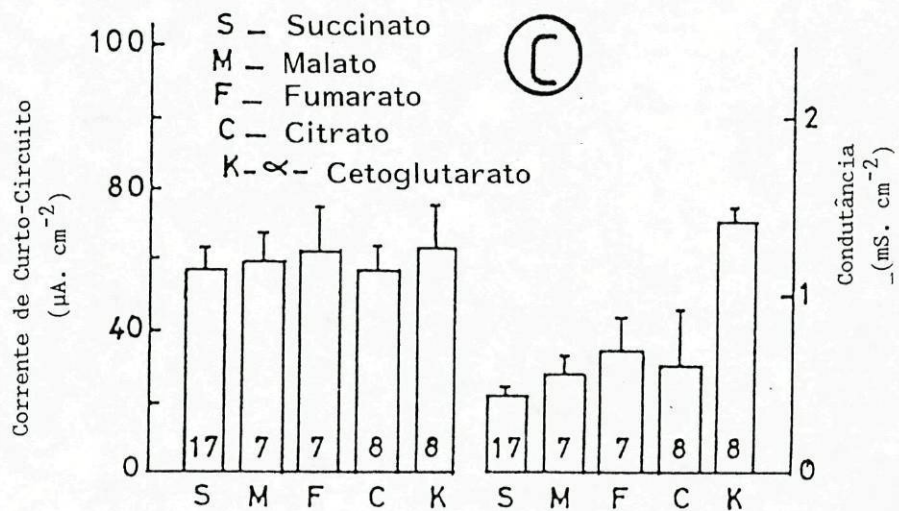
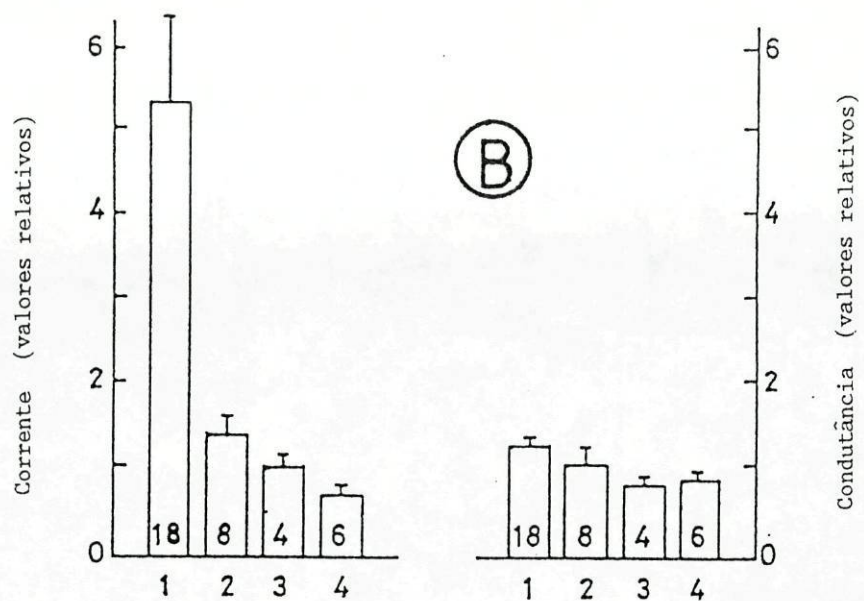
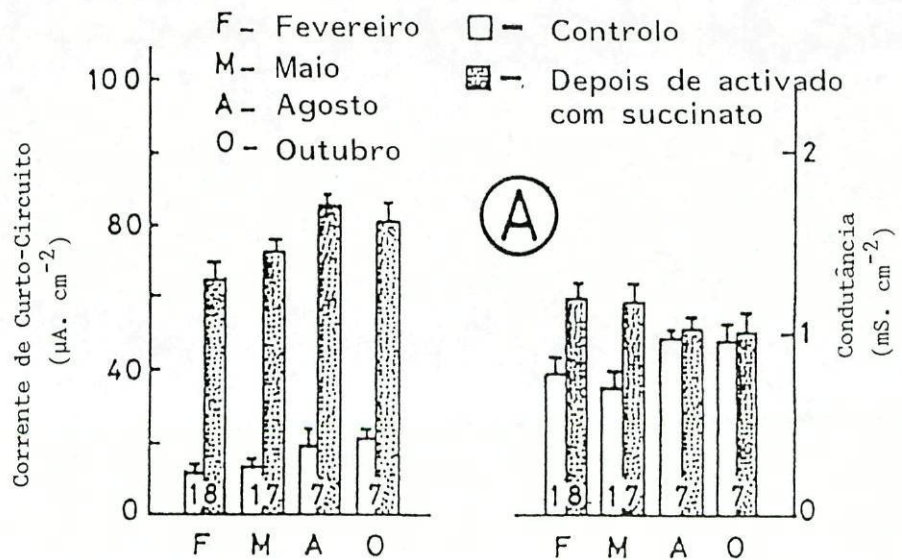
Fig. V.2 - Activação da corrente de curto-circuito no EEM pelos substratos.

Painel A: médias sasonais ( $\pm$ EPM) dos valores de correntes e condutâncias antes (barras não sombreadas) e depois (barras sombreadas) da activação com o succinato. O número de mantos estudados em cada grupo é indicado pelos valores na base das barras.

Painel B: médias ( $\pm$ EPM) dos valores das correntes e condutâncias depois da activação pelos diferentes processos, expressos como quocientes em relação ao tempo zero. 1) activação como a descrita na Fig. V.1; 2) activação como em 1 mas realizada a 15°C; 3) activação em duas fases. Incubação em solução control seguida de incubação em solução II. Ambas as fases a pH 7.2. 4) activação com solução control nas três fases, usando solução control do lado da hemolinfa a pH 4 na segunda fase. Número de experiências na base das barras.

Painel C: activação de correntes e condutâncias com os diferentes substratos. Os valores representados correspondem às médias ( $\pm$ EPM) das diferenças entre os valores medidos depois da activação e os valores no tempo zero. O número de experiências é indicado na base das barras.





ção completa, eles induzem um aumento de corrente a taxas diferentes. A taxa de activação com citrato ( $0.102 \pm 0.0041 \text{ min}^{-1}$ ,  $n=9$ ) é quase duas vezes a que se obtém com o succinato ( $0.056 \pm 0.0023 \text{ min}^{-1}$ ,  $n=9$ ). É provável que estas taxas reflitam as velocidades a que os substratos entram nas células do epitélio.

Com o objectivo de verificar se a corrente activada era ainda inibida pela iodocetamida, DNP e pelo Diamox efectuaram-se três tipos de experiências em que a activação pelo succinato foi primeiramente induzida e em seguida adicionados os respectivos inibidores a ambas as câmaras. Os efeitos obtidos podem ser vistos na Figura V.4. A iodocetamida provoca uma inibição muito rápida (em menos de dez minutos) e quase completa da corrente. O Diamox também inibe 80% da corrente em 30 minutos. Estes efeitos foram previamente descritos (Capítulo III) para correntes não activadas.

### 3-Discussão

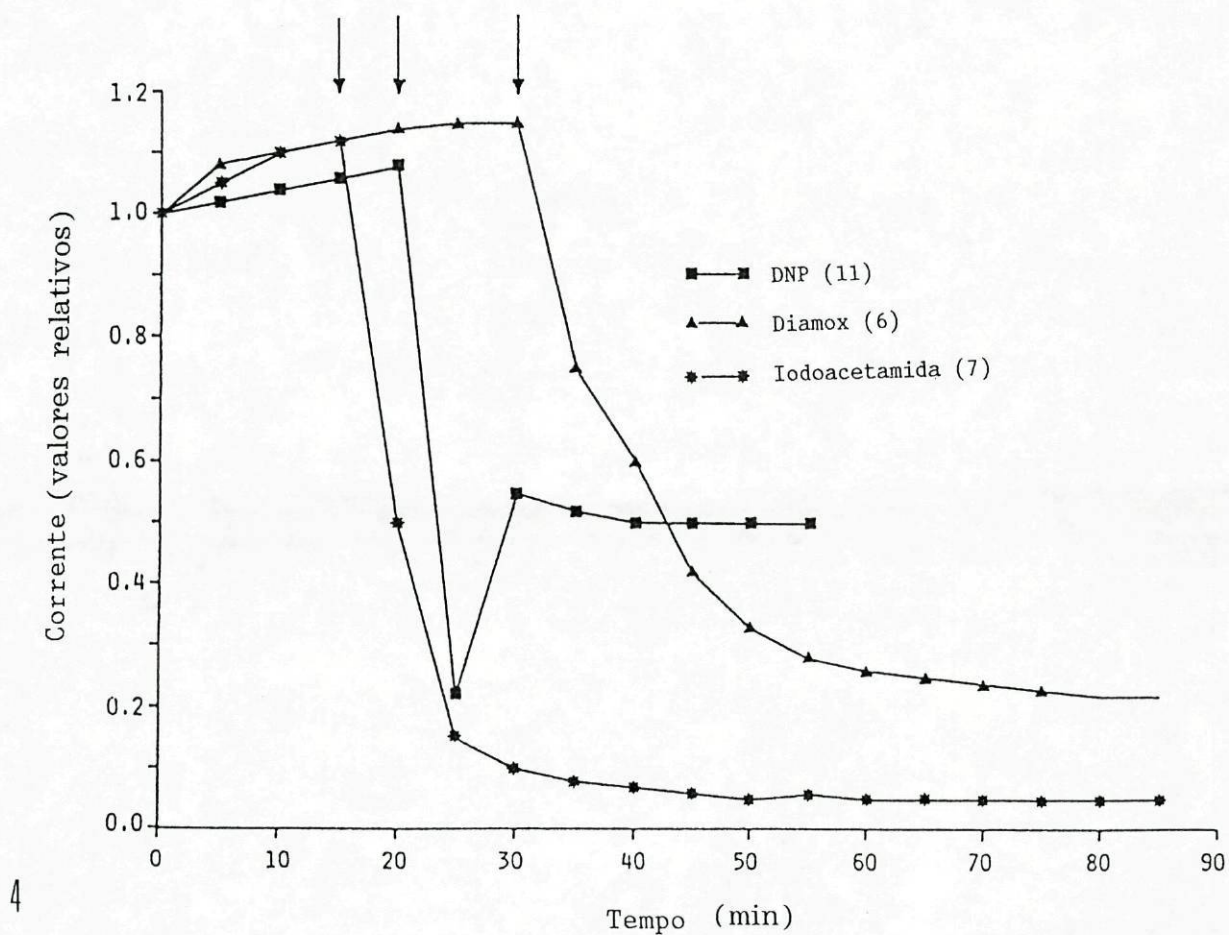
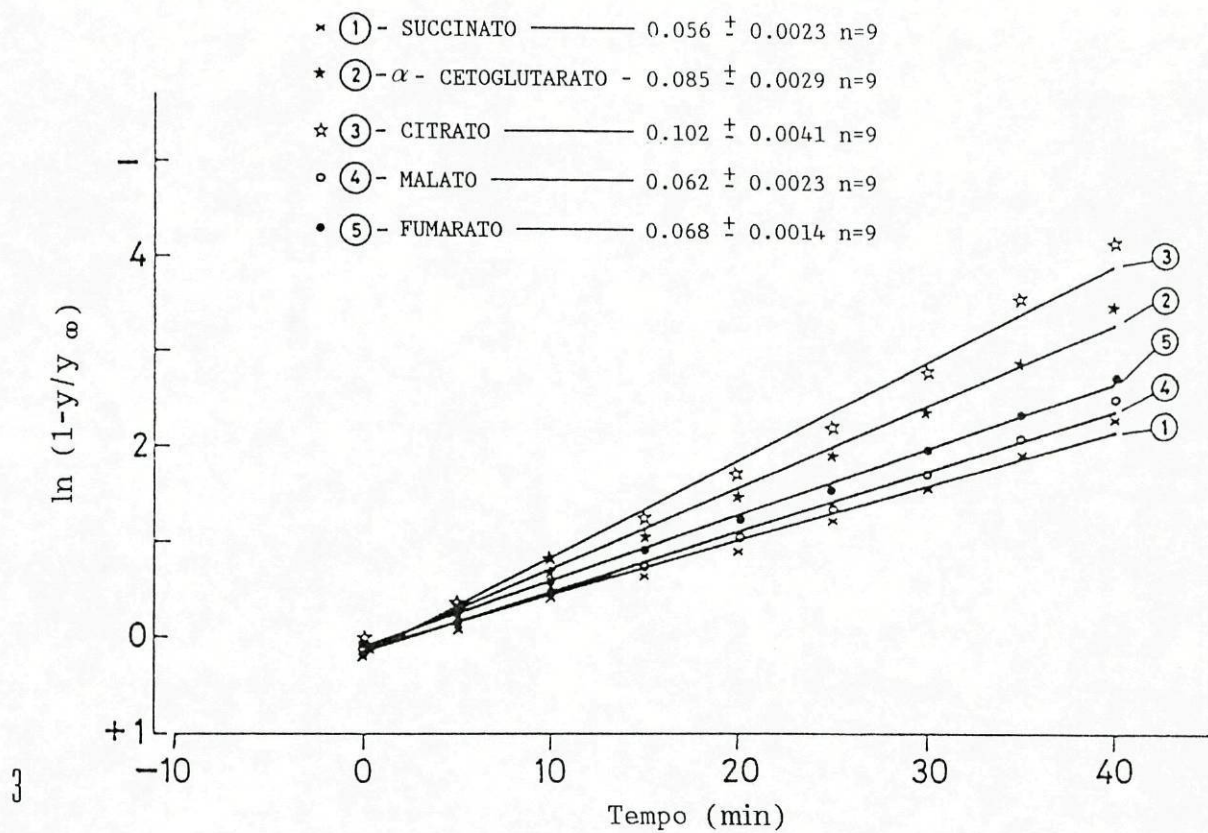
Uma explicação possível para as flutuações sazonais da corrente de curto-circuito e voltagem do EEM é que elas reflectem variações na capacidade dos sistemas de transporte responsáveis pela geração de corrente e potencial. Alternativamente elas podem resultar de mudanças na disponibilidade de substrato, nomeadamente ATP.

Há uma extensa literatura sobre o metabolismo dos moluscos (Hochachka, 1973; Zwaan, 1977) e as alterações metabólicas sazonais foram particularmente bem estudadas em *Mytillus edullis* (Zandee et al., 1980). Para muitos moluscos e em particular para



Fig. V.3 - Curvas semilogarítmicas da corrente de curto-circuito em função do tempo durante a activação (fase 3). Os valores das correntes medidos a intervalos de cinco minutos foram divididos pelo valor obtido no início da fase 3. Para cada grupo de experiências, correspondendo ao mesmo substrato, foram calculadas as médias destes quocientes ( $y$ ). O  $\ln(1-y/y)$ , onde  $y$  é o quociente médio em estado estacionário, foi representado em função do tempo em minutos. As taxas de activação ( $k$  em  $\text{min}^{-1}$ ) são dadas pelas inclinações das linhas. As taxas de activação  $\pm$  EPM e o número de experiências por substrato são apresentados na tabela inserida.

Fig. V.4 - Inibição da corrente de curto-circuito de mantos activados com succinato. Três grupos de EEM foram activados com succinato como o descrito na Fig. V.1. Nos tempos indicados pelas setas DNP (1 mM), diamox (1 mM) ou iodoacetamida (1 mM), foram adicionados respectivamente a ambos os lados. Os valores apresentados são as médias dos quocientes entre as correntes no tempo  $t$  e as correntes no tempo zero. Número de experiências em parêntesis.





os que vivem em zonas intertidais as temperaturas mais elevadas na primavera e verão dão origem a uma maior actividade metabólica e a um crescimento do corpo e da concha quase linear com o tempo (Zandee *et al.*, 1980). Bivalves de água doce, tais como a *A. cygnea*, vivem na lama de pequenos lagos, lagoas e rios onde o arejamento é fraco e onde a disponibilidade de oxigénio pode ser reduzida. Tais condições de hipoxia podem resultar em taxas elevadas de produção de protões que dão origem a uma acumulação de alanina (Gade *et al.*, 1975). Um pH baixo e uma concentração maior de alanina inibe a piruvatocinase e activa a fosfoenolpiruvatocinase (Hochachka, 1973). O resultado final é uma acumulação de succinato seguida de uma acumulação de propionato e acetato (Gade *et al.*, 1975).

A partir desta cadeia de acontecimentos será de esperar que os mantos tenham quantidades de succinato e de ácidos gordos voláteis mais elevadas no outono do que na primavera. É igualmente de esperar que mantos com conteúdos mais elevados de succinato e de ácidos gordos voláteis gerarão taxas mais elevadas de ATP e por isso correntes maiores, quando montadas nas câmaras onde estão expostos a concentrações elevadas de oxigénio.

Estas descrições são consistentes com as observações referidas previamente (Capítulo III). Neste Capítulo mostrámos que incubações com succinato provocam grandes aumentos na corrente de curto-circuito (Fig. V.1). Os efeitos de DNP e em particular de iodocetamida sugerem que a estimulação induzida da corrente é mediada por um aumento de ATP. Os efeitos de  $\alpha$ -cetoglutarato, citrato, malato, e fumarato pode serem explicados do mesmo modo (Hochachka, 1973).

O processo de activação só foi possível após um período curto (quinze minutos) de incubação da preparação com substrato a pH 4 para, presume-se, "carregar" as células com substrato. A partir daí a preparação gerou correntes muito elevadas que se mantiveram durante muitas horas, mesmo quando banhada por soluções sem substrato.

A activação máxima da corrente obtida uma hora após a incubação com substrato (segunda fase do processo de activação) foi idêntica para os cinco substratos testados, mas a velocidade a que a corrente aumentou logo após a incubação foi maior para os substratos com  $pK_a$ s mais baixos. Esta observação sugere que os substratos são absorvidos principalmente na forma dissociada.

TABELA V.1. Relação entre os  $pK_a$ s e os coeficientes de partilha octanol/água dos substratos e a velocidade de activação da corrente de curto-circuito.

Substrato	constante de taxa ( $\text{min}^{-1}$ )	$pK_a$	$AH/A_T$	P	$P \cdot AH/A_T$
Succinato	0.056	5.61	0.98	0.26	0.25
Malato	0.062	3.4	0.80	0.055	0.044
Fumarato	0.068	3.03	0.097	1.74(?)	0.17
$\alpha$ -cetoglutarato	0.085	<2.9	<0.074	-	-
Citrato	0.102	3.14	0.121	0.019	0.0023

$pK_a$ s a partir de Weast *et al.* (1984).

Coeficientes de partilha octanol/água (P) a partir de Leo *et al.* (1971).

Coeficiente de partilha do fumarato calculado a partir de dietil eter/água.

Coeficiente de partilha também segundo Leo *et al.* (1971).

Constantes de velocidade calculadas a partir da Fig. V.3.

A capacidade de um substrato atravessar a membrana celular, a um dado pH, por simples difusão é determinada, pelo menos, por dois factores: o seu  $pK_a$ , dado que é de esperar que as permeabilidades à forma dissociada sejam muito baixas; os coeficientes de partilha das formas não dissociadas dentro da membrana. A



Tabela V.1 refere os valores das taxas de activação da corrente de curto-circuito durante a fase III do processo de activação juntamente com os valores dos  $pK_a$ s (terceira coluna) e o coeficiente de partilha em octanol (quinta coluna). A quarta coluna refere as fracções das formas não dissociadas a pH 4 e na sexta coluna o produto dos coeficientes de partilha (P) pelas fracções das formas não dissociadas são apresentados. Pode-se ver que o succinato com o produto mais elevado (0.25) gera a velocidade mais baixa de activação ( $0.056 \text{ min}^{-1}$ ) enquanto que o citrato, que produz a velocidade de activação mais elevada ( $0.102 \text{ min}^{-1}$ ) corresponde ao produto mais baixo (0.0023).

Esta análise sugere que a activação é devida à penetração da forma dissociada e dado que esta entrada ocorre a um pH baixo (pH 4) ela é provavelmente mediada por um co-transporte de protão-substrato acionado pelo gradiente de protões.

O processo de activação é altamente sensível à temperatura (Fig. V.2B). Apesar desta poder conduzir a um abrandamento do metabolismo celular, um efeito de temperatura sobre uma penetração mediada do substrato não é de excluir.

A activação obtida com diferentes substratos foi muito acentuada (cinco a dez vezes) implicando que os sistemas de transporte responsáveis pela corrente estão abaixo da saturação.

As flutuações sazonais na actividade de transporte do EEM devem reflectir-se nas taxas de crescimento da concha. A precipitação de carbonato de cálcio, que é uma componente importante na formação da concha, implica uma libertação de protões para o compartimento extrapaleal e é bloqueada quando a concentração de protões neste compartimento aumenta como resultado, por exemplo, da

excreção de protões através da membrana apical do EEM. Isto sugere que, pelo menos em *A. cygnea*, o manto desempenha um papel regulador na formação da concha havendo uma taxa máxima de formação da concha na primavera e mínima no outono.

#### 4-Sumário

4.1 - A pré-incubação do EEM de *A. cygnea* com uma solução contendo succinato a pH 4 durante 15 minutos induz uma estimulação da corrente de curto-circuito de cerca de dez vezes.

4.2 - A corrente foi inibida pelo DNP, iodicetamida e diamox.

4.3 - Depois do período de incubação o succinato deixou de ser necessário para a manutenção da corrente durante muitas horas.

4.4 - Estimulações idênticas foram obtidas com citrato, fumarato,  $\alpha$ -cetoglutarato e malato.

5.5 - A pré-incubação foi efectiva apenas quando realizada a pH baixo (pH 4) e a temperaturas acima de 15°C no lado da hemolinfa.

4.6 - As correntes de curto-circuito mais elevadas, obtidas no verão e outono, são provavelmente devidas à acumulação de succinato.



## CAPÍTULO VI

### INDUÇÃO DA CALCIFICAÇÃO DA CONCHA POR ACIDOSE

A gênese da concha tem sido objecto de muitos estudos, principalmente em *Helix pomatia* (Manigault, 1933, 1939; Sioli, 1935; Wagge, 1951; Bierbauer, 1957; Abolins-Krogis, 1961a, 1961b; Saleuddin e Wilbur, 1969) e em *Lymnea stagnalis* (Kniprath, 1972; Geraerts, 1976a; Dogterom, *et al.*, 1979; Dogterom e Van der Schors, 1980; Dogterom e Jentjens, 1980). Realizaram-se alguns estudos idênticos em *A. cygnea* (Wilbur, 1964; Istin and Masoni, 1973; Wilbur e Saleuddin, 1983).

Como a concentração de cálcio no meio ambiente dos moluscos de água doce é muito baixa (Vaidya e Nagabhushanam, 1980) a calcificação da concha faz-se directamente a partir dos depósitos de cálcio do animal. Estes depósitos podem ocorrer no hepatopâncreas e no pé (Abolins-Krogis, 1961a; Becker *et al.*, 1974; Vaidya e Nagabhushanam, 1980), na glândula digestiva (Sioli, 1935; Wagge, 1951; Abolins-Krogis, 1961b), no rim (Sioli, 1935), e principalmente nas brânquias (Kado, 1960; Gupta, 1977) e no manto (Durning, 1957; Guardabassi e Piacenza, 1958; Tsujii, 1960; Abolins-Krogis, 1961b; Wilbur, 1964;) onde o cálcio pode ser armazenado em grânulos calcários. Estas formações resultam duma absorção contínua e lenta, durante quase todo ano, e podem desempenhar duas funções as quais parecem estar relacionadas com variações metabólicas (Richardot e Wautier, 1972). Dado que os moluscos têm um sistema circulatório aberto, a hemolinfa chega



a qualquer parte do corpo estabelecendo também contacto com o manto (Wilbur e Watabe, 1963). Deste modo, o cálcio libertado para a hemolinfa a partir de diferentes regiões pode estar facilmente disponível para a formação e reparação da concha (Vaidya e Nagabhushunam, 1980). Uma outra função destes grânulos calcários é a de funcionarem como depósitos de bicarbonato que podem ser usados como tampão quando ocorre uma acidose metabólica e/ou respiratória (Akberali *et al.*, 1977; Sminia *et al.*, 1977; Sparkes e Greenaway, 1984).

Em *A. cygnea* o manto constitui uma estrutura orgânica importante no armazenamento e mobilização do cálcio durante a formação e reparação da concha. Contudo, os factores implicados nos mecanismos de calcificação através dos quais o cálcio é mobilizado em direcção à concha não são muito bem conhecidos.

Por isso, decidimos estudar alguns aspectos morfofuncionais com o objectivo de esclarecer os factores primários que podem regular a mobilização dos grânulos calcários durante os processos de calcificação em *A. cygnea*.

## 1-Materiais e Métodos

A fim de perturbar o balanço ácido-base dos animais (*A. cygnea*), estes foram mantidos em duas condições: a pH 3 (ajustado com HCl) e a pH 11 (ajustado com NaOH). Um terceiro grupo, de animais control, foi colocado em condições idênticas a pH 6.7. Em todas as situações o pH foi frequentemente controlado. Depois de doze dias todos os animais foram removidos dos seus respectivos meios e procedeu-se à extracção da hemolinfa com seringas



Hamilton evitando o contacto com o ar pelo uso de parafina líquida. Nestas condições os valores de pH nas diferentes amostras foram imediatamente medidos usando um aparelho de pH Radiometer com um eléctrodo de dimensões adequadas de modo a poderem usar-se amostras pequenas (2 ml).

Depois da leitura de pH das amostras, os grânulos calcáreos aí existentes foram separados da fracção líquida da hemolinfa por centrifugação durante 10 minutos a 12 000 g. A concentração do cálcio e magnésio solúvel existente no supernadante foi medido com um espectrofotómetro de absorção atómica Pye Unicam SP9.

A face interna das conchas em cada animal foi cuidadosamente observada e as películas recentemente formadas foram investigadas. Estas películas foram observadas com um microscópio electrónico de varrimento JEOL JSC-35C e feita a identificação por microanálise dispersiva do carbonato de cálcio nos fragmentos minerais formados sobre a película. Fez-se também uma observação histológica do epitélio extrapaleal extraído de mantos de animais submetidos a um meio ácido e comparou-se com o de animais em situação control. Para estes estudos utilizou-se a técnica topográfica de hemalúmen-eosina e a reacção citoquímica de Schiff em ácido periódico depois da digestão enzimática pela amilase.

## 2-Resultados

### 2.1-Concentrações de cálcio e de magnésio e valores de pH na Hemolinfa

As concentrações de cálcio e de magnésio e os valores de pH da hemolinfa nos três grupos de animais estão representados na Tabela VI.1. O pH da hemolinfa de animais control foi de 7.26



e tornou-se mais ácido (6.72) em animais colocados em água a pH 3. A hemolinfa dos animais colocados em água alcalina de pH 11 apenas mostrou uma ligeira alteração para 7.33.

A concentração de cálcio aumentou significativamente em animais mantidos em meio ácido passando de um valor control de 6.50 para 11.84 mM/l. A alteração do teor de cálcio em animais mantidos em meio básico foi muito pequena. Não houve mudanças significativas nas concentrações de magnésio.

TABELA VI.1. Concentrações de cálcio e magnésio (mM) na hemolinfa e os respectivos valores de pH em várias situações experimentais. Os valores P correspondem ao erro de segundo grau das diferenças relativas a todos os parâmetros.

Água	Ácido(pH3)		Control(pH6.5)		Alcalino(pH11)
Número de animais	6		6		6
Hemolinfa					
pH	6.72 ±0.13	NS	7.26 ±0.19	NS	7.33 ±0.07
Ca	11.84 ±1.16	P<0.001	6.50 ±0.96	NS	6.26 ±1.50
Mg	0.19 ±0.05	NS	0.17 ±0.04	NS	0.16 ±0.03

## 2.2-Aspectos ultraestruturais da película calcificada

Após doze dias de tratamento, encontrou-se uma película recente apenas nos animais mantidos em meio ácido. A Figura VI.1 mostra uma matriz orgânica sem qualquer textura aparente (superfície lisa) e alguns cristais com uma estrutura em agulha fixos à matriz orgânica subjacente. Na Figura VI.2 é possível ver muitos fragmentos, com cerca de 1.0 µm de espessura e formas variáveis, resultantes da fragmentação da camada mineral previamente existente. Pode-se observar uma região restrita onde os fragmentos ainda fixos têm uma superfície lisa (posição origi-



Fig. VI.1 - Película calcificada sobre a face interna da concha de um animal em acidose metabólica (pH 3 durante 12 dias). Matriz orgânica (MO); Agulhas cristalinas de carbonato de cálcio (AC). x8100.

Fig. VI.2 - Fragmentos livres da camada calcária formados sobre a matriz orgânica (FL); Fragmentos fixos à matriz orgânica (\*). x5400.

Figs VI.3 e VI.4 - Ampliação dos fragmentos calcários. Face lisa (L); Face com cristais de cálcio em agulha (A). x30000; x36000.

Fig. VI.5 - Microanálise por energia dispersiva mostrando a presença de carbonato de cálcio. Matriz orgânica (MO); Fragmento calcáreo (FC); Registro computadorizado (R); local de leitura (LR). x16500.

nal).

Os cristais em agulha, facilmente identificados numa das suas faces por ampliação dos fragmentos livres (Fig. VI.3 e VI.4), parecem ser um prolongamento dos cristais em agulha observados na Figura VI.1. A outra face é lisa e está em contacto com o manto (Fig. VI.3 e VI.4). Estes fragmentos são formações de carbonato de cálcio como se provou por microanálise (Fig. VI. 5).

Comparados com os animais control (meio a pH 6.7), os animais mantidos em meio ácido (pH 3) e básico (pH 11) têm, no manto, uma quantidade de grânulos de cálcio mais baixa e mais alta respectivamente. Estas diferenças foram observadas ao microscópio electrónico de varrimento.

### 2.3-Aspectos morfológicos e citoquímicos do epitélio extrapaleal

As observações ao microscópio óptico com a técnica topográfica de hemalúmen-eosina mostraram zonas de proliferação celular no epitélio extrapaleal de animais em água acidificada (Fig. VI.6).

No mesmo epitélio observou-se uma reacção fortemente positiva ao reagente Schiff (Fig. VI.7). Este resultado traduz a existência de uma grande quantidade de glicogénio dado que ele se torna negativo quando a preparação é previamente submetida à digestão pela amilase (Fig. VI.7 e VI.7a). Observaram-se células mucosas que normalmente têm lugar na formação da matriz orgânica (Figs VI.7 e VI.8)



Fig. VI.1 - Película calcificada sobre a face interna da concha de um animal em acidose metabólica (pH 3 durante 12 dias). Matriz orgânica (MO); Agulhas cristalinas de carbonato de cálcio (AC). x8100.

Fig. VI.2 - Fragmentos livres da camada calcária formados sobre a matriz orgânica (FL); Fragmentos fixos à matriz orgânica (\*). x5400.

Figs VI.3 e VI.4 - Ampliação dos fragmentos calcários. Face lisa (L); Face com cristais de cálcio em agulha (A). x30000; x36000.

Fig. VI.5 - Microanálise por energia dispersiva mostrando a presença de carbonato de cálcio. Matriz orgânica (MO); Fragmento calcáreo (FC); Registro computadorizado (R); local de leitura (LR). x16500.

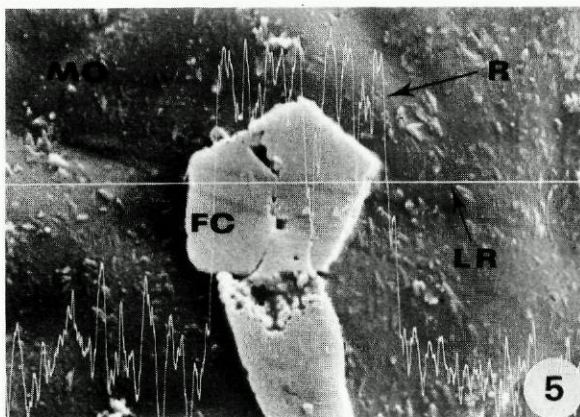
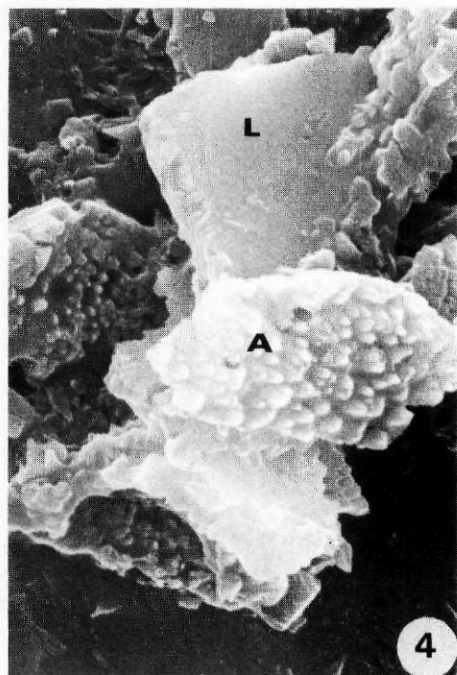
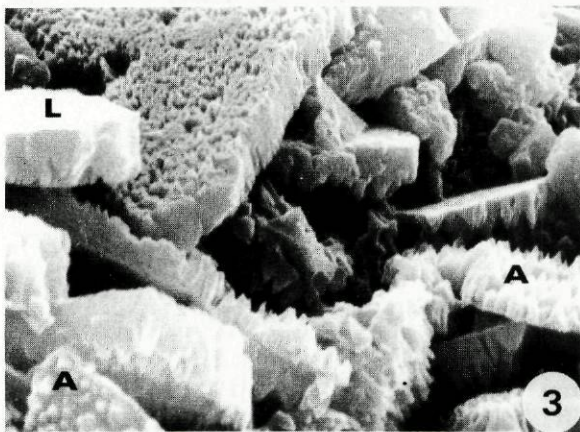
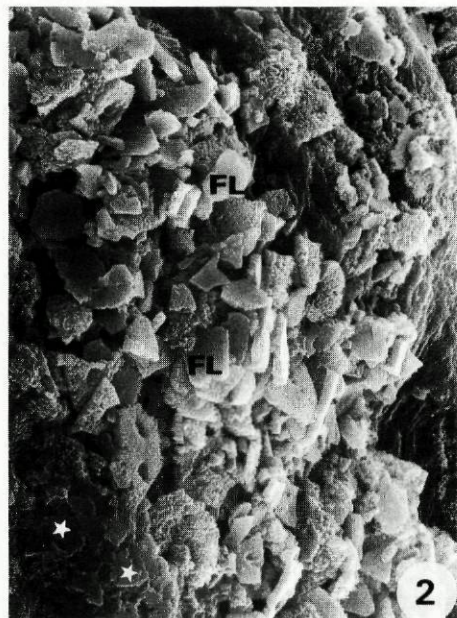
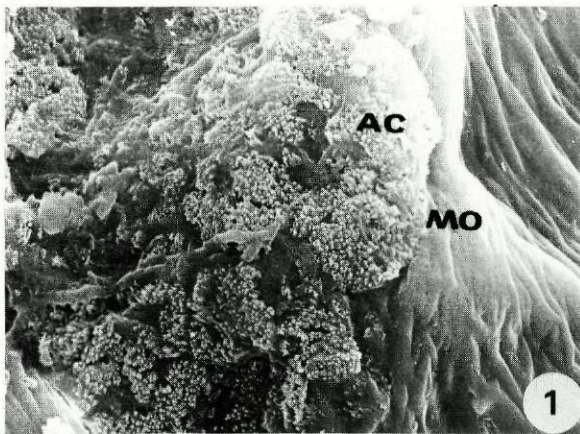
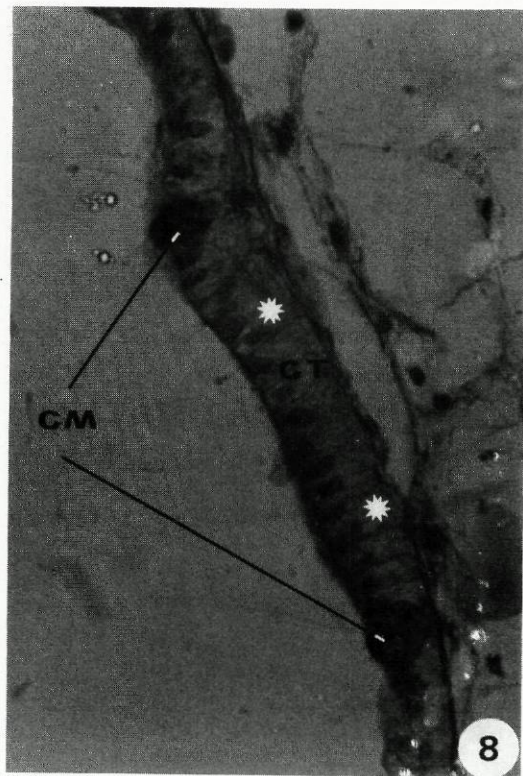
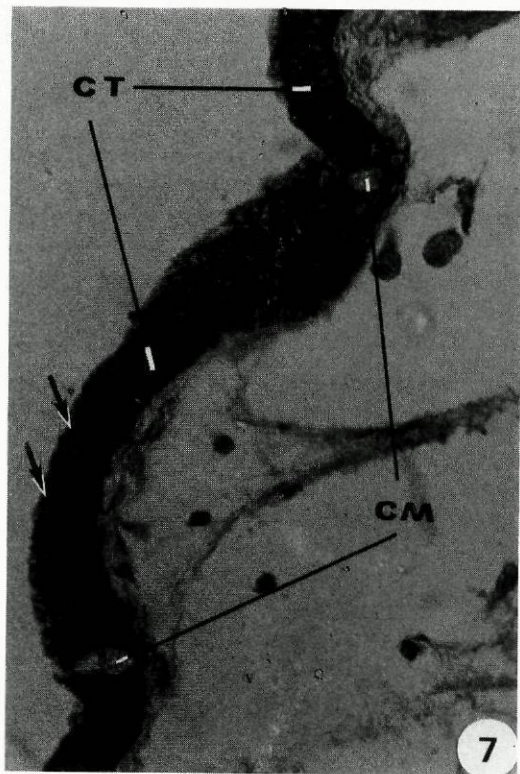
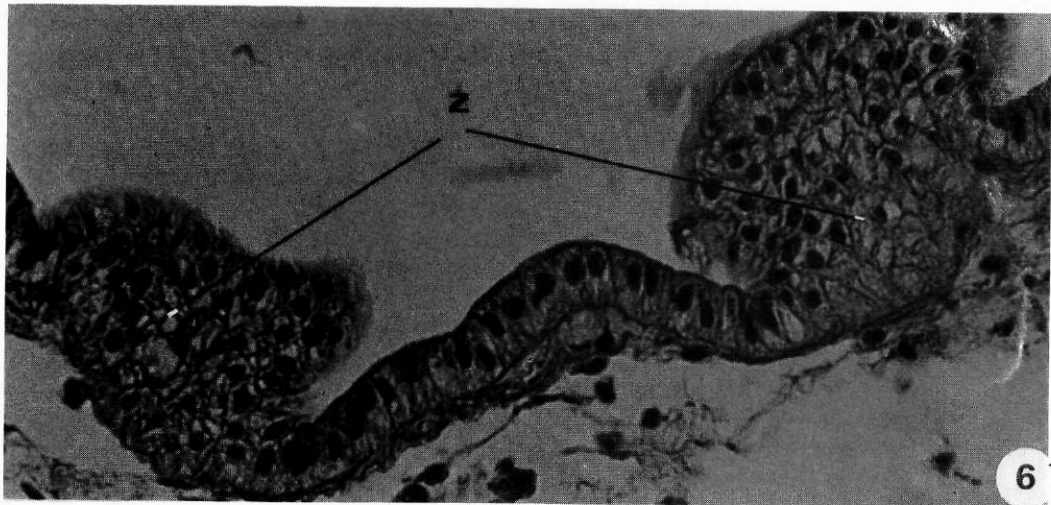




Fig. VI.6 - Proliferação celular no epitélio extrapaleal do manto (EEM), em situação de acidose, corado pelo hemalúmen-eosina e observada em microscopia óptica. Zonas de crescimento (Z). x1563.

Figs VI.7 e VI.8 - Coloração pelo reagente Schiff e digestão do glicogénio pela amilase no EEM de um animal em acidose. Grandes quantidades de glicogénio (setas); células mucosas (CM); Áreas com o glicogénio digerido (\*); células epiteliais típicas (CT). x1563.





### 3-Discussão

Para os moluscos em geral há várias referências sobre a função dos depósitos de  $\text{CaCO}_3$  (da concha, da hemolinfa ou intracelular) no tamponamento do meio interno (Dugal, 1939; Istín e Girard, 1970; Burton, 1970, 1972, 1976; Akberali *et al.*, 1977; Sminia *et al.*, 1977; Sparkes and Greenway, 1984).

Segundo Sminia *et al.* (1977), quando há um balanço positivo de prótons as variações do pH interno são tamponadas pela liberação de bicarbonatos a partir de depósitos de  $\text{CaCO}_3$  (Sminia *et al.*, 1977). Os depósitos de  $\text{CaCO}_3$  estão em equilíbrio com o cálcio e o carbonato da hemolinfa e indirectamente com a concentração de prótons e de bicarbonatos. Um decréscimo de pH provoca a solubilização de  $\text{CaCO}_3$  formando-se iões de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Sminia *et al.*, 1977). Deste modo, um aumento da concentração de cálcio na hemolinfa é um indicador de acidose (Sminia *et al.*, 1977). O aumento da concentração de cálcio pode resultar de uma diminuição da concentração de bicarbonatos nas acidoses metabólicas.

Os resultados agora obtidos por acidose metabólica em *A. cygnea* confirmam esta hipótese. Encontramos um pH apenas ligeiramente mais baixo, o dobro da concentração de cálcio solúvel na hemolinfa e uma clara redução de grânulos calcários no manto quando comparados com o control. Estas observações sugerem que o aumento da concentração de cálcio é devido, pelo menos em parte, à solubilização dos grânulos calcários originando um gradiente de cálcio através do EEM que é bastante permeável aos iões de cálcio (Kirschner *et al.*, 1960; Istín e Maetz 1964; Istín e Kirschner 1968; Capítulo III). O mecanismo de transporte de



cálcio tem sido considerado um processo difusional (Kirschner *et al.*, 1960; Istin e Maetz, 1964; Istin e Kirschner, 1968). Todos estes dados estão de acordo com a formação rápida duma película calcificada na face interna da concha. Contudo, alguns autores (Akberali *et al.*, 1977; Dugal, 1939) sugeriram que o  $\text{CaCO}_3$ , na acidose metabólica, é mobilizado da concha para a hemolinfa o que está em contradição com as presentes observações que indicam uma mobilização da hemolinfa para a concha.

No entanto, numa análise geral, verifica-se que estudos indicando a mobilização de  $\text{CaCO}_3$  da concha para a hemolinfa, em acidose, foram realizados em moluscos marinhos os quais têm depósitos de cálcio consideravelmente mais baixos do que as espécies de água doce.

Estes dados sugerem que existem diferenças importantes entre os moluscos marinhos e os de água doce, no que se refere aos mecanismos de mobilização de depósitos de  $\text{CaCO}_3$  quando ocorre uma alteração do pH interno.

Nos animais conservados em meio alcalino desenvolveu-se um grande aumento no número de grânulos calcários no manto sem mudanças significativas de pH e concentrações de cálcio e sem qualquer erosão na face interna da concha. Isto sugere que os depósitos de  $\text{CaCO}_3$  em contacto com a hemolinfa aumentaram como resultado da retenção de mais  $\text{HCO}_3^-$  e da absorção contínua de cálcio a partir do meio externo (por exemplo, nas brânquias) (Kado, 1960; Gupta, 1977). Em condições experimentais, a alcalose é totalmente compensada por este mecanismo (aumento dos depósitos de  $\text{CaCO}_3$ ). Por outro lado, durante a acidose, os depósitos de  $\text{CaCO}_3$  podem ser insuficientes para tamponar o meio interno.



As concentrações de iões de  $Mg^{++}$  não se modificaram significativamente nas três situações experimentais sugerindo que os sais deste ião quase não participam no tamponamento do pH.

As observações em microscopia óptica permitiram-nos mostrar que em *A. cygnea* e durante a acidose apareceram zonas de proliferação celular e uma grande quantidade de glicogénio no epitélio extrapaleal do manto. Estas características são típicas de estruturas em actividade de crescimento, visto ser possível observar idêntica proliferação celular no manto de animais em período de crescimento normal.

Os períodos de crescimento e formação da concha estão limitados principalmente aos meses de primavera e verão, ocorrendo a secreção, pelo manto, duma matriz orgânica com um aumento simultâneo do metabolismo e subsquente acidose (Zandee *et al.*, 1980).

O ácido succínico forma-se muito provavelmente como o produto final de metabolismo (Akberali *et al.*, 1977). De acordo com Richardot e Wautier (1972) há uma boa correlação entre o metabolismo e o volume dos grânulos calcários. Assim, durante o período de primavera e sobretudo durante o verão terá lugar a mobilização dos depósitos de  $CaCO_3$ .

Deste modo, pode-se postular que durante o período normal de crescimento da concha de moluscos de água doce, o aumento do metabolismo dos animais e subsquente redução de pH são os principais factores que contribuem para a calcificação da concha. A mobilização dos depósitos de  $CaCO_3$  em contacto com a hemolinfa conduzem a uma neutralização do pH.

#### 4-Sumário

4.1 - Na face interna da concha de animais mantidos em meio ácido formou-se uma película calcificada devido à intensa secreção de matriz orgânica e à deposição de cálcio mobilizado a partir das reservas internas do manto.

4.2 - Na hemolinfa observou-se, em relação ao control, um pH ligeiramente mais baixo, uma concentração de cálcio livre mais elevada e um número reduzido de grânulos calcários no manto.

4.3 - Verificou-se uma intensa proliferação celular no EEM e uma grande quantidade de glicogênio nas suas células.

4.4 - Nos animais mantidos em meio alcalino apenas se observou um grande aumento no número de grânulos calcários do manto.



## CAPÍTULO VII

### BIOMINERALIZAÇÃO DA MATRIZ ORGÂNICA

A biomineralização da matriz orgânica das conchas de moluscos foi recentemente objecto de vários estudos. Wilbur, o primeiro proponente da teoria de epitáxia, sugeriu que a matriz tem uma importante função reguladora na formação da concha (Wilbur, 1976; 1984; Wilbur e Simkiss, 1979). O crescimento dos cristais, condicionado pela matriz estrutural subjacente, constitui um modelo básico de formação esquelética adoptado por muitos organismos (Lowenstam, 1971) e a análise da organização estrutural dos constituintes macromoleculares da matriz poderá vir a fornecer uma chave para o conhecimento da natureza do control de biomineralização (Weiner, 1984). Segundo Degens (1976), Weiner (1979) e Weiner e Traub (1981) a matriz calcofílica compõe-se de duas unidades estruturais: uma proteína insolúvel (complexo quitino-proteico) em forma de folha à qual se unem fracções ácidas solúveis (matriz mineralizante) com forte afinidade para os iões de cálcio.

Estudos realizados por Beedham (1954) e por nós (Capítulo 2) revelaram a presença de quitina na matriz orgânica da concha de *A. cygnea*. Outros trabalhos nossos (Capítulos III, V, VI, VIII, IX) mostraram uma relação estreita entre a quitina e a componente mineral e evidenciaram mecanismos de transporte iónico através do epitélio extrapaleal que podem condicionar grandemente o processo de calcificação.

Neste capítulo propomo-nos mostrar a afinidade entre a quitina e os cristais de aragonite, na camada nacarada de *A. cygnea*, e estudar a evolução da forma cristalina correlacionando este fenómeno com dados recentes sobre o metabolismo de cálcio.

## 1-Materiais e Métodos

Extraíram-se películas orgânicas da face interna da concha de vários animais (*A. cygnea*) e agruparam-se em camadas paralelas para análise por difracção de raio-X utilizando para leitura a técnica de Straumanis numa câmara Debye-Scherrer de 11.4 cm. Foi usado um gerador de energia PW 1130/00 operando a 40Kv e 20 mA (Rad.  $\text{CuK}\alpha$ ). Aplicou-se separadamente, durante 10-12 horas, um feixe de incidência paralela e um feixe de incidência perpendicular à superfície de duas amostras. Realizou-se ainda uma análise por incidência perpendicular com películas enroladas e submetidas a um movimento de rotação.

A camada nacarada da concha foi também analisada por difracção do raio-X utilizando a técnica do filme plano com um gerador Philips 1030 operando a 40Kv e 20mA (Rad.  $\text{CuK}\alpha$ ). A amostra foi irradiada por transmissão, durante 7-8 horas, com um feixe monocromático após ter atravessado um colimador de 0.5mm de diâmetro.

A face interna da região central da concha foi observada com um microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-35C a 25 Kv com o objectivo de analisar as formas cristalinas nas diferentes épocas do ano. Os fragmentos da concha foram montados em pequenos suportes de alumínio com uma subcapa de prata condutora e cobertos por uma camada delgada de ouro. Estas observações foram



feitas em vários meses do ano utilizando de cada vez conchas de três animais.

## 2-Resultados

Os diagramas de raio-X obtidos em câmaras Bebye-Sherrer por incidência perpendicular e paralela à superfície de películas orgânicas mineralizadas (Figs VII.1 e VII.2) foram analisados e seus resultados apresentados respectivamente na Tabelas VII.1 e VII.2.

**TABELA VII.1.** Representação de parâmetros das distâncias reticulares e respectivos índices da  $\alpha$ -quitina e da aragonite, em películas frescas e mineralizadas, calculados a partir de parâmetros determinados por Carlström (1957) e Rudall (1963). O feixe de incidência é perpendicular à superfície da amostra (Fig. 1).

Linha	dÅ	hkl	Observação
1	10.70	010	$\alpha$ -quitina *
2	5.50	013	$\alpha$ -quitina
3	4.60	101	$\alpha$ -quitina
4	4.30	110	aragonite+ $\alpha$ -quitina
5	3.80	103	quitina
6	3.60	015	quitina
7	3.42	111	aragonite
8	3.28	021	aragonite
9	3.00	002	aragonite
10	2.72	121;012	aragonite
11	2.50	200	aragonite
12	2.40	031	aragonite
13	2.34	112;130;022	aragonite
14	2.20	211	aragonite
15	2.12	220	aragonite
16	1.98	221	aragonite
17	1.88	041;202	aragonite
18	1.82	132	aragonite
19	1.75	141;113	aragonite
20	1.56	311	aragonite
21	1.51	232;241	aragonite
22	1.48	321;151	aragonite
23	1.42	312	aragonite
24	1.24	400	aragonite

\* O diagrama de difracção do raio-X de películas quitinosas é muito diferente do diagrama de quitina pura. As reflexões de raio-X estão mal definidas, mas é possível definir os índices desta "quitina nativa" dentro dos limites de correcção.

Estas tabelas mostram os parâmetros dos planos reticulares de dois compostos e os respectivos índices. A interpretação deste radiograma permite-nos identificar a  $\alpha$ -quitina e a aragonite na película orgânica (matriz da concha). O diagrama de difracção de raio-X obtido por movimento de rotação da amostra (Fig. VII.3), mostra claramente a reflexão da unidade de quitinobiose com o período característico 10.3 Å. A tabela relativa à Figura VII.3 corresponde à sobreposição das Tabelas VII.1 e VII.2 acima referidas. O espectro de difracção de raio-X da camada nacarada, obtido em câmara plana, mostra cristais de aragonite com estrutura pseudo-hexagonal (Fig. VII.4 e Diag. 1). Observam-se ainda halos em direcção radial unindo as manchas que definem os vértices das formas hexagonais. Estas manchas resultam das reflexões de planos cristalográficos específicos de um monocristal de aragonite. As distâncias reticulares dos planos de reflexão e seus índices estão representados na Tabela VII.3.

As imagens morfológicas da camada nacarada da concha observadas em grande ampliação com o microscópio electrónico de varrimento mostram que em todas as amostras o processo de calcificação ocorre simultaneamente em dois ou três níveis diferentes (Figs VII. 6-13). Cortes transversais da mesma camada revelam um grande número de lamelas calcárias, de 1  $\mu$ m de espessura, separadas por um espaço interlamelar muito estreito originado a partir da película orgânica (Fig. VII.5). A película orgânica quando presente sobre a camada calcária, reduz a qualidade de imagem (Figs VII.7-9) e pode ser nitidamente individualizada como uma estrutura definida (Fig. VII.9) ou como simples fragmentos (Figs VII.11 e VII.12).



Figs VII.1 e VII.2 - Espectro de difracção de raio-X efectuado numa câmara de Debye-Scherrer a partir de películas quitinosas mineralizadas, extraídas da face interna da concha. O feixe incidente é respectivamente perpendicular e paralelo às amostras. As distâncias reticulares e os seus índices estão representados nas Tabelas VII.1 e VII.2. Banda de quitina (seta).

Fig. VII.3 - Espectro de difracção de raio-X efectuado numa câmara de Debye-Scherrer com películas quitinosas mineralizadas extraídas da face interna da concha. As películas foram submetidas a um movimento de rotação. Neste espectro a reflexão (10.3A) da unidade de quitinobiose é evidente. Banda de quitina (seta).

Fig. VII.4 - Espectro de difracção de raio-X da camada nacarada da concha, com a técnica de camera plana, mostrando uma estrutura pseudo-hexagonal. As manchas resultam das reflexões de planos cristalográficos específicos dos monocristais de aragonite. As distâncias reticulares dos planos de reflexão estão representadas na Tabela VII.3.

Fig. VII.5 - Observação dum corte transversal da camada nacarada da concha ao microscópio electrónico de varrimento. Lamelas calcárias (LC). Espaço interlamelar (seta). x18.000.

Fig. VII.6 - Superfície interna da camada nacarada mostrando cristais romboédricos de aspecto um pouco irregular, durante o mês de Maio. x15.000.

Fig. VII.7 - Superfície interna da camada nacarada mostrando cristais ainda romboédricos durante o mês de Junho. A imagem ligeiramente turva deve-se à presença de uma película orgânica sobre os cristais. x15.000.

Fig. VII.8 - Superfície interna da camada nacarada mostrando cristais de formas irregulares durante Julho e Agosto. A imagem ligeiramente turva deve-se à presença de uma película orgânica sobre os cristais. x15.000.



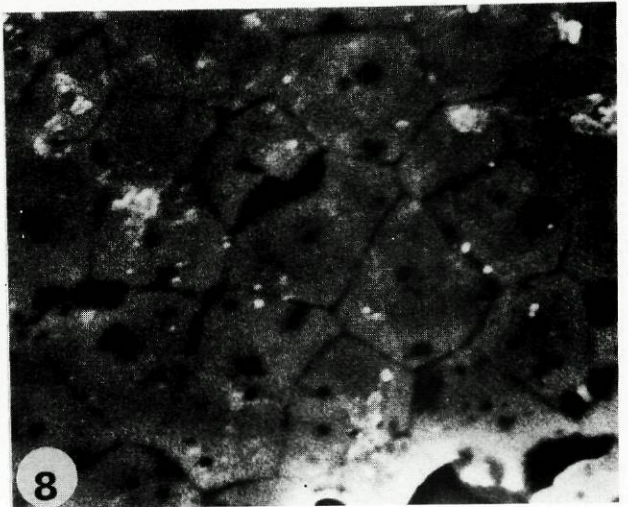
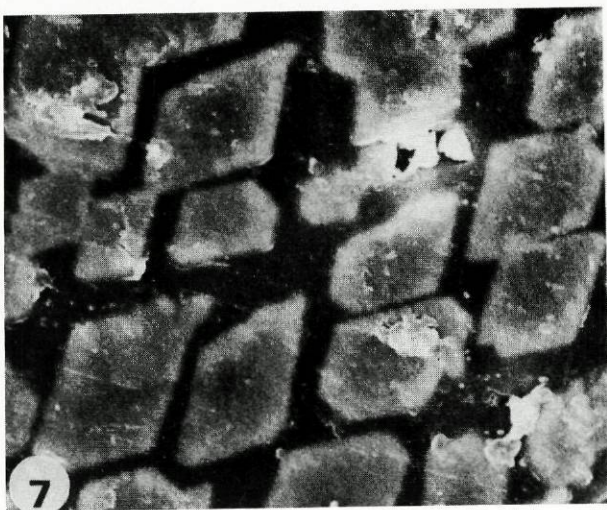
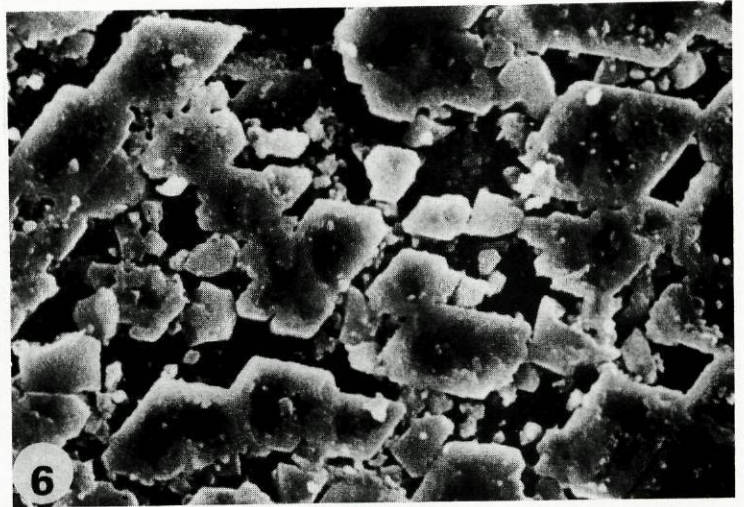
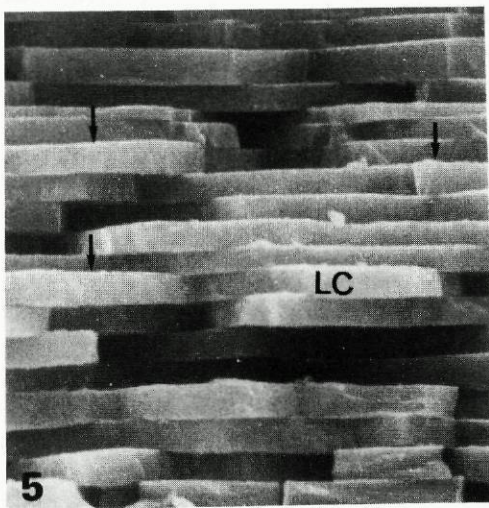
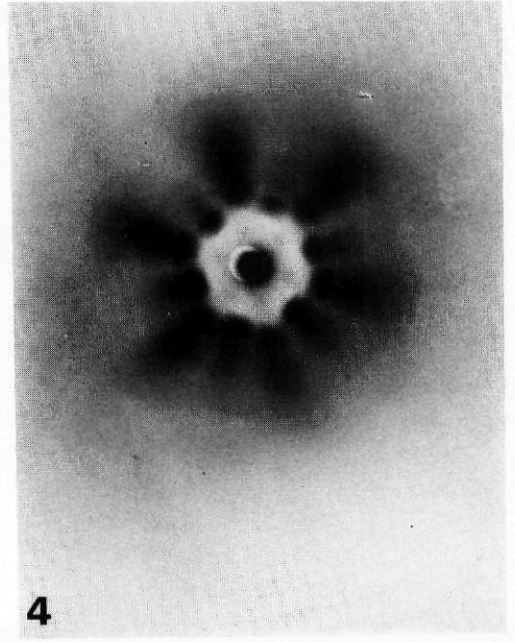
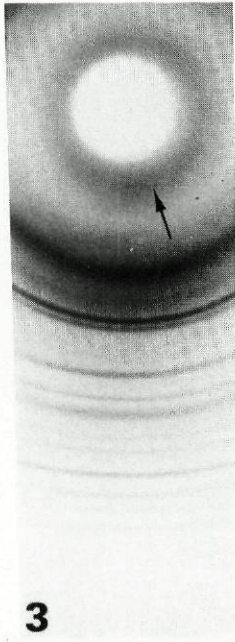
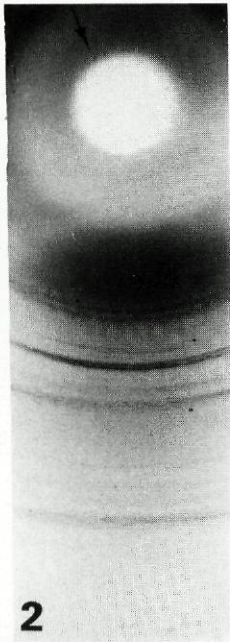
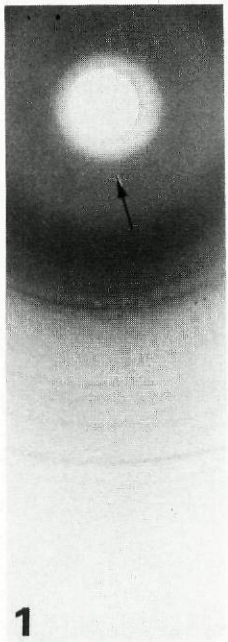




Diagrama 1

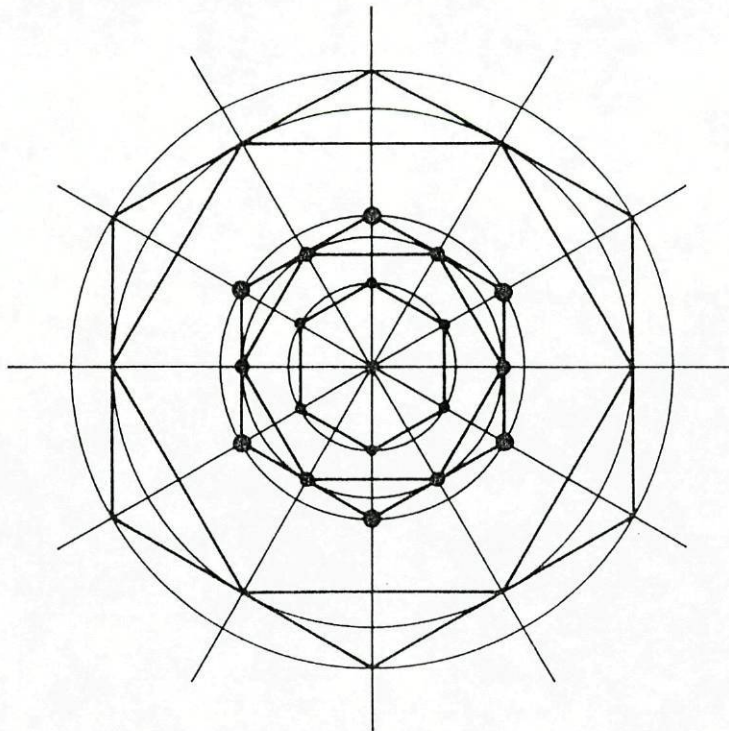


Diagrama 1 - Representação esquemática dos planos de reflexão realçando a simetria pseudo-hexagonal da aragonite quando se usa a técnica de câmara plana no estudo da camada nacarada.

**TABELA VII.2.** Representação de parâmetros das distâncias reticulares e respectivos índices da  $\alpha$ -quitina e da aragonite, em películas frescas e mineralizadas, calculados a partir de parâmetros determinados por Carlström (1957) e Rudall (1963). O feixe de incidência é paralelo à superfície da amostra (Fig. 1).

Linha	dÅ	hkl	Observação
1	11.20	010	$\alpha$ -quitina *
2	5.40	013	$\alpha$ -quitina
3	4.30	110	aragonite+ $\alpha$ -quitina
4	3.46	015	$\alpha$ -quitina
5	3.38	111	aragonite
6	3.23	021	aragonite
7	2.86	002	aragonite
8	2.80	121	aragonite
9	2.74	012	aragonite
10	2.68	012	aragonite
11	2.55	200	aragonite
12	2.48	200	aragonite
13	2.43	200	aragonite
14	2.39	031	aragonite
15	2.34	112	aragonite
16	2.28	130;022	aragonite
17	2.09	211;220	aragonite
18	1.96	221	aragonite
19	1.88	041;202	aragonite
20	1.79	141;113	aragonite
21	1.74	231	aragonite
22	1.70	222	aragonite
23	1.39	312;330	aragonite
24	1.35	114	aragonite
25	1.23	400	aragonite
26	1.21	134;243;062	aragonite
27	1.18	153;162;260	aragonite

\* Observações idênticas às da Tabela 1.

**TABELA VII.3.** Determinação das distâncias reticulares segundo os planos de reflexão dos cristais de aragonite da camada nacarada, calculados a partir de parâmetros standard para a aragonite. O feixe de incidência é perpendicular à superfície da amostra (Fig. 4).

dÅ	4.14	2.50	2.10	1.48	1.13
hkl	110	200	220	330	-

Relativamente à morfologia dos cristais de  $\text{CaCO}_3$  na região central da concha, encontraram-se várias formas ao longo do ano (Figs VII.6-13). As Figuras VII.6-10 (Maio-Setembro) mostraram deposições calcárias com formas geométricas gradualmente irregu-



Fig. VII.9 - Superfície interna da camada nacarada mostrando depósitos calcários de formas irregulares em Setembro e cobertos parcialmente por uma película orgânica (Po) muito espessa sobre a camada calcária. x5.000.

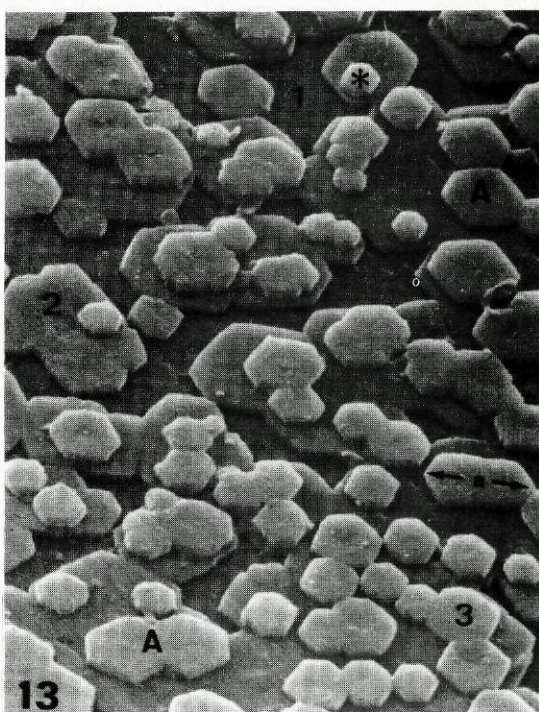
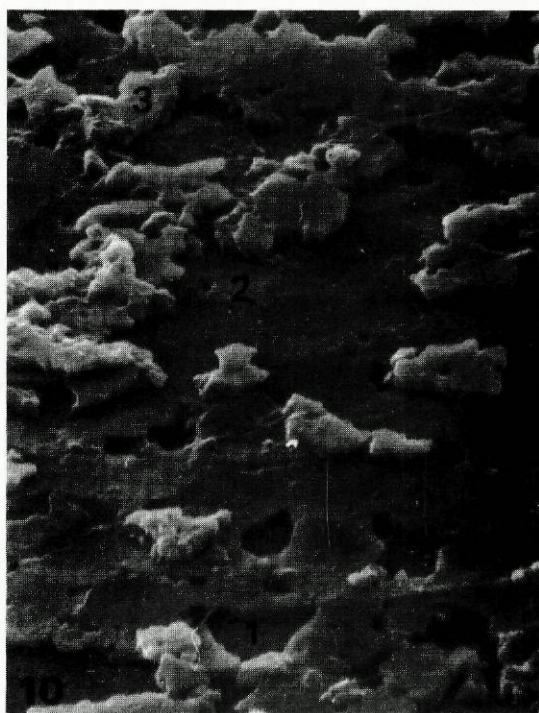
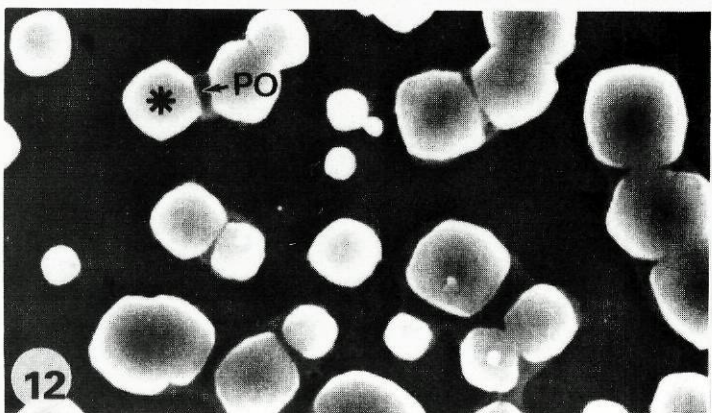
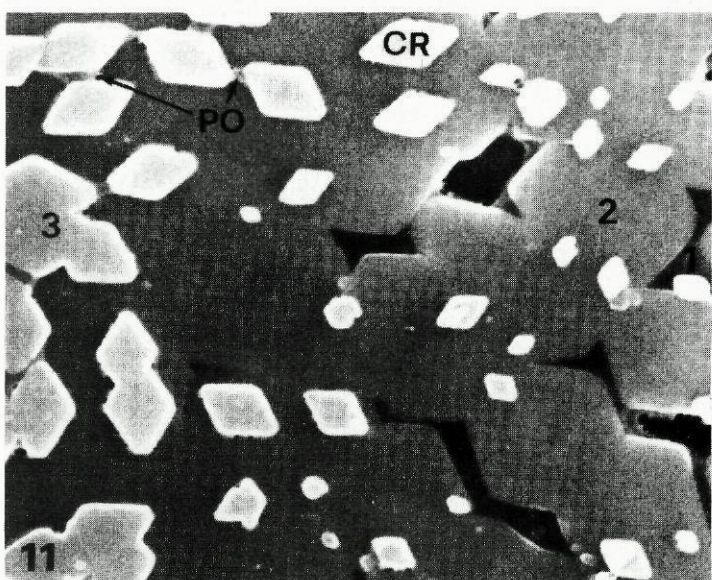
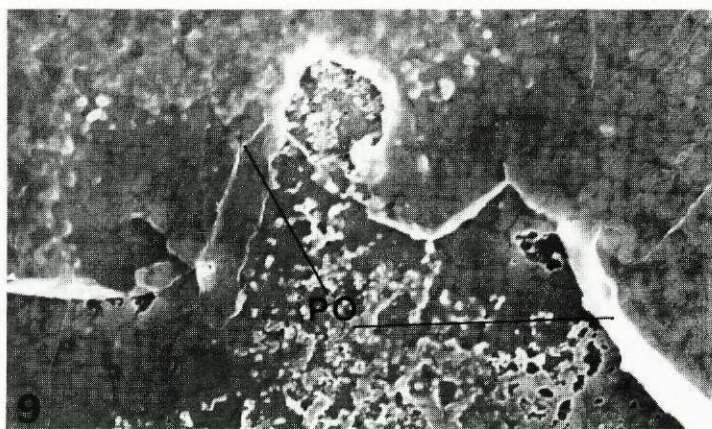
Fig. VII.10 - Ampliação da superfície interna da camada nacarada, não encoberta pela película, mostrando depósitos calcários com formas irregulares no mês de Setembro. Três camadas de calcificação distintas (1, 2, 3). x10.000.

Fig. VII.11 - Observação da superfície interna da camada nacarada em Outubro e Novembro mostrando cristais romboédricos (CR) com formas muito regulares cobertos por fragmentos delgados de película orgânica (PO). Três camadas de calcificação distintas (1, 2, 3). x15.000.

Fig. VII.12 - Observação da superfície interna da camada nacarada mostrando cristais de formas intermédia mas regulares em Dezembro (\*) e cobertos por fragmentos delgados de película orgânica (PO). x15.000.

Fig. VII.13 - Observação da superfície interna da camada nacarada em Fevereiro mostrando cristais de formas regulares muito elaboradas. Os cristais hexagonais de aragonite (A) estão alinhados com o seu eixo a (a) aproximadamente paralelo. Pequenos cristais próximos da margem da face 001 (\*). Três camadas de calcificação distintas (1, 2, 3). x10.000.







lares cobertas por uma película espessa. Ao contrário, as Figuras VII.11-13 (Outubro-Fevereiro) mostram cristais com formas geométricas gradualmente regulares. O aspecto hexagonal correspondente à forma geométrica mais complexa do cristal ocorre no inverno. Estes cristais são alongados segundo o eixo cristalográfico *a* e orientam-se com este eixo paralelamente uns aos outros e à superfície da concha (Fig. VII.13). O crescimento lateral dos cristais faz-se simultaneamente em várias camadas e continua até se formar uma placa sólida. Podem-se observar pequenos cristais nas margens da face 001 de cristais subjacentes (Fig. VII.13).

### 3-Discussão

Vários estudos recentes referem as propriedades e as funções da matriz orgânica de estruturas calcificadas em organismos vivos (Watabe, 1965; Crenshaw, 1982; Krampitz *et al.*, 1983; Mann, 1983; Weiner *et al.*, 1983, Roer e Dillaman, 1984; Wilbur, 1984). Uma das funções da matriz é a de poder actuar como uma superfície activa dando início ao crescimento do cristal quer por epitáxia quer por ionotropia (Greenfield *et al.*, 1984; Weiner, 1984; Wheeler e Sikes, 1984; Wilbur, 1984). Através dos mecanismos de epitáxia e ionotropia a matriz regula a nucleação, a selecção polimórfica, a orientação do cristal, o crescimento do cristal, a direcção e/ou a inibição do crescimento do cristal (Lowenstam, 1981; Greenfield *et al.*, 1984; Wheeler and Sikes, 1984; Wilbur, 1984).

A quitina foi recentemente descrita como um importante composto específico da matriz orgânica (Mann, 1988). Segundo



Poulicek *et al.*, (1986), a quitina não parece estar directamente envolvida no processo de calcificação, mas alguns dados fisiológicos e evolutivos sugerem uma interacção indirecta entre a quitina e o metabolismo de cálcio. Esta afinidade é de certo modo confirmada por resultados do Capítulo IX onde se prova que a inibição da secreção de quitina provoca uma grande alteração no aspecto morfológico das camadas internas desintegrando-as totalmente.

Os nossos resultados confirmam a presença de quitina devido à ocorrência de algumas reflexões típicas, para além da banda de reflexão 4.1-4.9A (100) já identificada (Capítulo II). Deste modo, o período de reflexão 10.2A (010) originado pela unidade de quitinobiose e as reflexões das distâncias reticulares (010), (013), (015), (135) correspondem ao espectro característico de  $\alpha$ -quitina (ortorrômbico). Estes resultados foram obtidos a partir dos parâmetros indicados por Carlström (1957) e Rudall (1963). A existência no radiograma de uma banda larga e mal definida, correspondente à reflexão da quitina, sugere uma associação com outro composto. A associação a uma proteína será mais provável dado ser vulgar ocorrer em conchas de moluscos e cutículas de insectos e crustáceos (Roer and Dillaman, 1984; Rudall, 1963; Poulicek *et al.*, 1986).

Observações da face interna da concha ao microscópio electrónico de varrimento mostraram claramente cristais com hábito hexagonal, paralelamente orientados segundo o eixo-a e crescendo simultaneamente em dois ou três planos distintos. O Lauegrama da camada nacarada revela que estes cristais são de aragonite devido às reflexões: 4.14A (110); 2.50A (200); 2.10 (220) e 1.40A (330).



Há também evidência duma estrutura monocristalina pseudo-hexagonal resultante da associação ocasional de cristais de aragonite. Observaram-se ainda halos agrupando radialmente manchas que constituem os vértices dos hexágonos. Isto ocorre devido à componente da radiação branca, presente no feixe incidente, ser reflectida por cristais deformados (asterismo).

A relação indirecta entre a quitina e a aragonite indicada por Poulicek *et al.*, (1986) é aqui confirmada em parte pela estrutura ortorrômbica da  $\alpha$ -quitina e aragonite de razoável estabilidade (polimorfismo paralelo) e pela mesma distância reticular dos planos {110}. A textura lamelar destes compostos, que reflecte o fraco crescimento segundo a direcção de menor força de coesão [001], traduz também um sinal desta relação (Fraenkel e Rudall, 1940; 1947). Os dados apresentados não demonstram a simetria pseudo-hexagonal da quitina, contudo, a rotação em espiral entre as fibras de quitina, sugerido por Mutvei (1974) e Roer e Dillaman (1984), leva a admitir que pode induzir a simetria pseudo-hexagonal da aragonite.

Embora a cristalização do  $\text{CaCO}_3$  na estrutura da aragonite, possa ser regulada por propriedades intrínsecas da matriz orgânica a forma externa do cristal pode ser influenciada por alguns factores exógenos (Mutvei, 1969; Wada, 1970; Blackwell *et al.*, 1977) alguns dos quais foram por nós identificados (Capítulos III, IV, VIII) podendo ser correlacionados com a variabilidade observada nas formas cristalinas e assim sugerir que se está em presença de um mecanismo de control. Tal como descreveu no Capítulo IV, a barreira apical do epitélio extrapaleal excreta protões para o lado da concha regulando o pH do líquido extrapa-



leal. Esta extrusão é mais intensa durante o período de Outubro-Dezembro. Assim, a partir de Outubro o líquido extrapaleal apresenta um aumento da concentração de protões os quais reduzem a concentração de bicarbonatos. Por outro lado, um decréscimo no gradiente de cálcio através do EEM, durante este período (Capítulo VI) resulta numa diminuição dos movimentos de cálcio em direcção ao líquido extrapaleal. Haverá então uma deposição de  $\text{CaCO}_3$  muito lenta na camada interna da concha, o que torna possível o aparecimento de formas geométricas mais ou menos regulares e complexas. É no inverno que surgem cristais sob a forma de hábitos hexagonais (forma mais elaborada). Embora a taxa de extrusão de protões esteja reduzida no inverno (Capítulo III) a temperatura e a mobilização de cálcio são menores (Capítulo VI) favorecendo assim uma deposição de  $\text{CaCO}_3$  mais lenta. Ao contrário, formas geométricas cada vez mais irregulares surgem a partir da primavera devido a um aumento gradual do gradiente de cálcio através do EEM (Capítulo VI) a uma extrusão de protões baixa e a temperaturas mais elevadas induzindo uma deposição rápida de  $\text{CaCO}_3$ . Esta alteração cíclica da taxa de calcificação também foi observada por Poulicek (1986) e Zandee *et al.* (1980) e constitui um fenómeno paralelo às flutuações sazonais de substratos energéticos no EEM proposto Capítulo V. De acordo com o descrito no Capítulo III parece razoável admitir que a variedade de formas cristalinas resulte principalmente de um balanço entre a mobilização de cálcio (subsequentemente de  $\text{HCO}^{-3}$ ) e a secreção de protões através do EEM em direcção ao líquido extrapaleal induzindo quer uma cristalização lenta (formas regulares) quer uma cristalização rápida (formas irregulares).



As nossas observações com o microscópio electrónico de varrimento demonstram também que o ciclo de formação da concha durante o ano compreende um grande número de períodos de calcificação. Isto é evidente se compararmos a idade da concha (em anos) com o número de lamelas calcárias presentes na camada nacarada. Esta deposição sucessiva de várias lamelas calcárias ao longo de um ano indica uma actividade metabólica intensa e alternada (orgânica e mineral) no manto de *A. cygnea*.

#### 4-Sumário

4.1 - A análise por difracção de raio-X da camada nacarada da concha de *A. cygnea*, revelou cristais de aragonite (com simetria pseudo-hexagonal) e de  $\alpha$ -quitina formando dois componentes importantes no processo de calcificação.

4.2 - A estrutura ortorrômbica destes compostos com tendência para uma forma mais estável, a idêntica distância reticular dos planos {110}, e a textura lamelar destes dois compostos sugerem uma forte afinidade entre eles.

4.3 - Nas observações ao microscópio electrónico de varrimento da superfície interna da concha encontraram-se cristais de  $\text{CaCO}_3$  com formas geométricas que variam ao longo do ano. As formas mais irregulares ocorreram na primavera e verão e as mais regulares no outono e inverno.

4.4 - A variedade de formas dos cristais poderá depender do balanço entre os iões de cálcio e de hidrogénio no líquido extrapaleal ao longo do ano.



## CAPÍTULO VIII

### ESPESSAMENTO DA CONCHA PELO TBTO (POLUENTE)

Alguns compostos organoestanhos, como por exemplo o óxido de tributil de estanho (TBTO) e o fluoreto de tributil de estanho (TBTF), têm sido recentemente usados como biocidas contra algas marinhas (Zuckerman *et al.*, 1978; Alzieu *et al.*, 1980, 1982).

Os compostos de tributil de estanho estão presentes na água e nos sedimentos sendo a sua principal fonte as tintas aplicadas em pequenos barcos e embarcações de recreio afim de evitar a fixação das algas (Alzieu *et al.*, 1980, 1982; Maguire *et al.*, 1982; Maguire, 1984) e o crescimento anual no seu uso faz aumentar a possibilidade de poluição do ambiente (Maguire *et al.*, 1984). Tem-se verificado que, a presença de concentrações elevadas de pequenas partículas na água pode constituir um factor responsável por alguma malformação da concha de moluscos (Key *et al.*, 1976; Alzieu, 1981; Alzieu *et al.*, 1982; Waldock and Thain, 1983, 1986).

Considera-se, deste modo, de algum interesse a avaliação dos efeitos de TBTO na forma da concha e a correlação dessas observações com o comportamento electrofisiológico do EEM de *Anodonta cygnea*.

## 1-Material e Métodos

O local de colheita dos animais (*A. cygnea*) e as técnicas da sua conservação no laboratório, do isolamento do EEM e o seu estudo electrofisiológico foram já descritos anteriormente (Capítulo III).

Um grupo de 8 animais foi tratado em tanques experimentais (10 litros) a que se adicionaram 80 µl da solução stock de óxido de tributil de estanho (TBTO). A concentração final estimada, de TBTO, cerca de 0.2 µg/l, foi calculada a partir da densidade da solução stock e da solubilidade na água. Um outro grupo de 8 animais foi conservado em situação control. A água foi continuamente arejada nos dois grupos. Oito dias após o início da experiência a face interna das conchas foi observada. Películas recentes foram removidas das conchas dos animais sujeitos ao tratamento com TBTO e analisadas ao microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-35. O carbonato de cálcio foi identificado nos fragmentos formados sobre a película pela microanálise de energia dispersiva.

Nos estudos electrofisiológicos, depois de um período de control, pequenas quantidades de TBTO foram adicionadas separadamente no lado da hemolinfa e no lado da concha até atingir uma concentração final de cerca de 10nM.



## 2-Resultados

Todos os animais tratados "in vivo" com TBTO apresentavam, no final do período experimental, uma película consistente resultante da segregação de matrix orgânica sobre a superfície interna da concha.

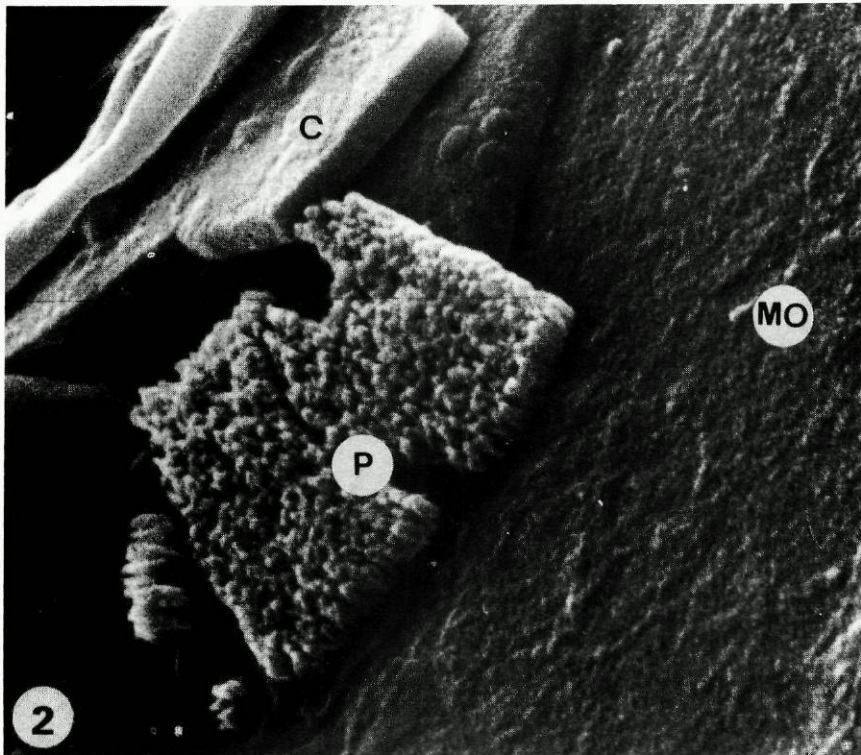
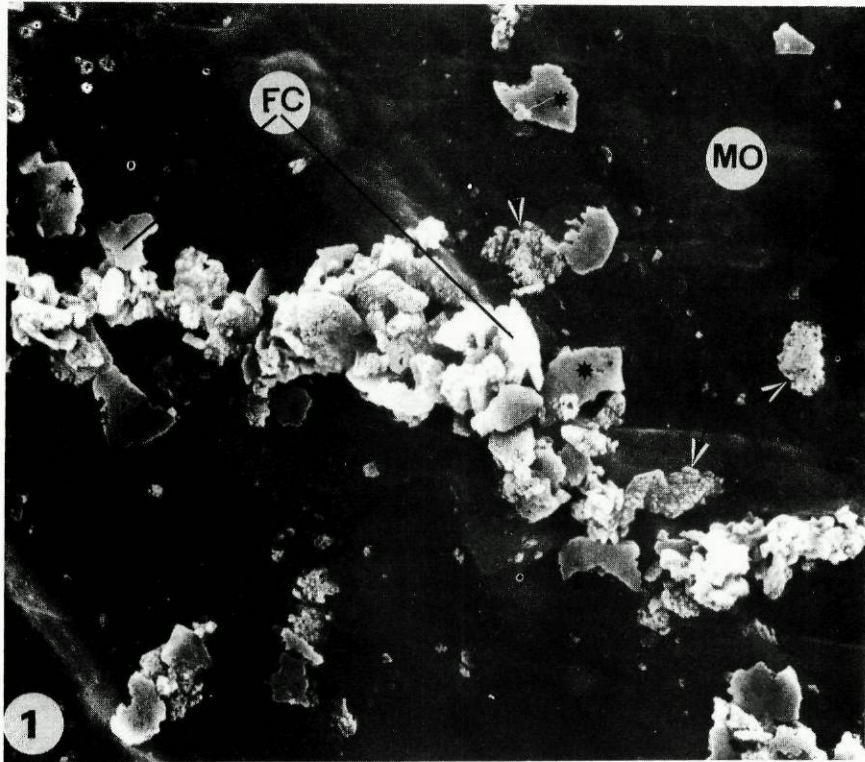
Quando se observaram as películas ao microscópio electrónico de varrimento, encontraram-se depósitos de material inorgânico sobre a matriz orgânica (Fig. VIII.1 e VIII.2) que se identificaram como sendo fragmentos calcários pela microanálise de energia dispersiva. As películas não tinham qualquer tipo de textura aparente. Os cristais calcários não apresentavam qualquer forma típica e constituíam grupos isolados, dispersos com regularidade sobre a matriz orgânica. Comparativamente apenas um dos animais de control apresentava uma película frágil e sem quaisquer depósitos calcários.

Nos estudos electrofisiológicos observou-se uma quebra rápida de 81% ( $\pm 0.02$ ) na corrente de curto-circuito quando o TBTO foi adicionado no lado da concha (Fig. VIII.3). Obtiveram-se inibições menores de corrente quando quantidades mais baixas de TBTO foram usadas. A condutância transepitelial diminuiu 36% ( $\pm 0.02$ ) no primeiro caso (Fig. 3). Quando o TBTO foi adicionado no lado da hemolinfa ocorreu um efeito muito lento caindo a corrente de 6% ( $\pm 0.03$ ) depois de trinta minutos. Neste caso, a condutância transepitelial não variou.

Fig. VIII.1 - Matriz orgânica (MO) segregada sobre a face interna da concha de um animal em tratamento com TBTO. Grupo de fragmentos calcáreos (FC) formado sobre a matriz orgânica; Faces lisas (\*) e rugosas (setas) dos fragmentos calcários. x9.000.

Fig. VIII.2 - Ampliação dos fragmentos calcários. Fragmentos porosos (P) e fragmentos compactos (C); Matriz orgânica (MO). x50.000.





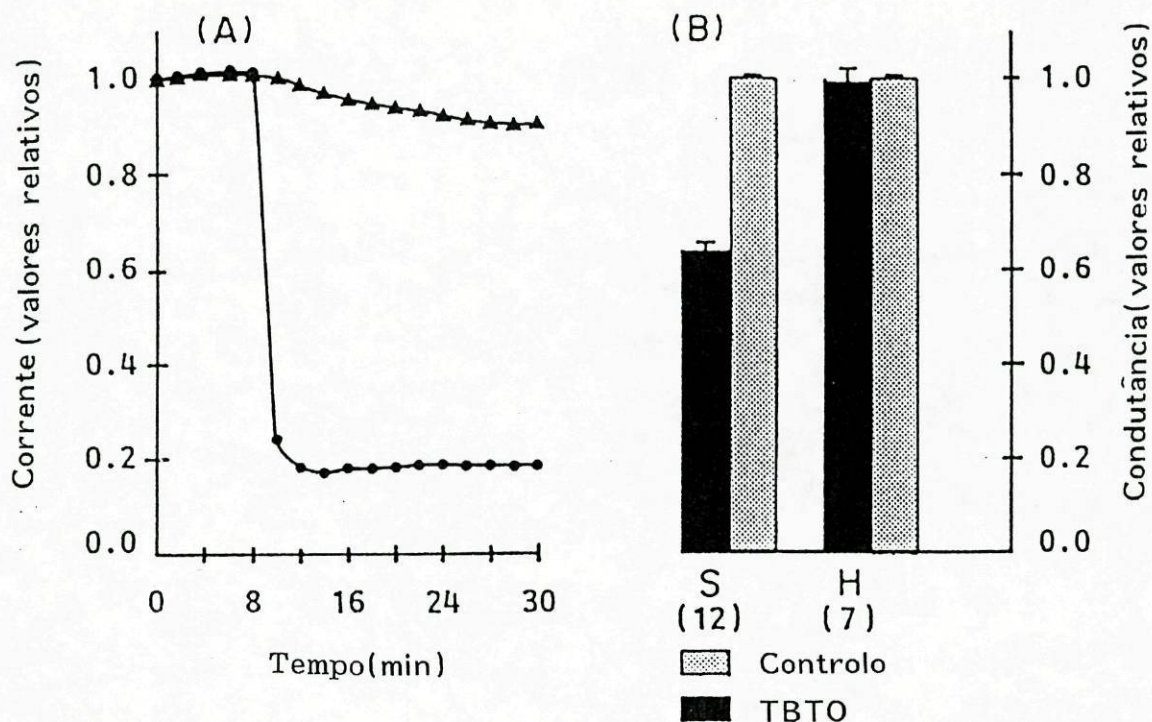


Fig. VIII.3 - Efeito do TBTO observado no EEM, separadamente do lado da hemolinfa e do lado da concha. **A)** Foi estudado o efeito inibidor sobre a corrente de curto-circuito do lado da hemolinfa (triângulos) e do lado da concha (círculos) em sete e doze preparações respectivamente. Os valores representados são a média dos quocientes entre os valores medidos no tempo  $t$  e os do tempo zero. **B)** Os valores control e experimentais da condutância representados no cimo de cada barra, são a média dos rários H: inibidor adicionado do lado da hemolinfa, em sete preparações (7). S: inibidor adicionado do lado da concha, em doze preparações (12).



### 3-Discussão

Em experiências de bioacumulação ensaiadas em mexilhões marinhos, *Mytilus edulis*, quando se dissolveu o óxido de tributil de estanho (TBTO) na água ou se associou ao fitoplâncton *Isochrysis galbana*, observou-se a ocorrência de uma absorção rápida (Laughlin et al., 1986). Houve uma nítida acumulação em alguns tecidos: vísceras, brânquias, manto e músculo. Este produto ou outros compostos semelhantes, quando acumulados nos tecidos, podem induzir uma deformidade na concha que se caracteriza por um espessamento das valvas (Galtsoff, 1969; Key et al., 1976; Alzieu et al., 1980; Alzieu, 1981; Alzieu et al., 1982; Waldock and Thain 1983, 1986).

As nossas observações na concha de *A. cygnea* mostraram que há uma segregação intensa de matriz orgânica (película) sobre toda a face interna da concha quando se realizam tratamentos com baixa concentração de TBTO (0.2 µg/l). Esta película apresentava alguns depósitos calcários. Nestas condições, todos os animais evidenciaram idênticas características indicando que este biocida pode ser um forte indutor de espessamento das valvas.

Por outro lado os estudos de electrofisiologia provaram que o TBTO tem um efeito inibidor rápido sobre a corrente de curto-circuito quando actua do lado da concha. Este efeito do TBTO mostra que esta barreira (apical) é fortemente electrogénica. Tal como se descreve no Capítulo III e IV há uma extrusão, a taxas idênticas, de ácido através da membrana apical do EEM em direcção à concha e de base através da membrana basal em direcção à hemo-linfa. Deste modo, a diminuição da extrusão de ácido pelo TBTO

para o lado da concha pode constituir um importante factor para induzir a deposição de  $\text{CaCO}_3$  causando assim o espessamento da concha. Simultaneamente, o decréscimo esperado da extrusão de base para o lado da hemolinfa, produzirá uma maior libertação de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Ca}_{++}$  a partir das micropérolas do manto (Capítulo VI) os quais difundem através do EEM, muito permeável a estes iões (Capítulo III). Os dados, acima descritos, sugerem que os depósitos de  $\text{CaCO}_3$  na concha de *A. cygnea*, provocados pelo TBTO "in vivo", resultam duma inibição do transporte de protões em direcção á concha e duma maior mobilização de cálcio a partir das reservas na hemolinfa.

#### 4-Sumário

4.1 - O tratamento com baixas concentrações de TBTO ( $0.2 \mu\text{g/l}$ ) provocou, "in vivo" e ao fim de oito dias, a segregação duma matriz orgânica calcificada sobre a face interna da concha de *A. cygnea*.

4.2 - Estudos electrofisiológicos realizados no epitélio extrapaleal do manto (EEM) mostraram que a corrente de curto-circuito foi fortemente inibida pelo TBTO ao actuar do lado da concha. Pelo contrário, do lado da hemolinfa o efeito é muito lento.

4.3 - O efeito do TBTO sobre os mecanismos de transporte de protões e/ou de bicarbonatos através do EEM pode constituir um factor importante no espessamento da concha.



## CAPÍTULO IX

### DESORGANIZAÇÃO DA MATRIZ ORGÂNICA PELO DIFLUBENZURON (POLUENTE)

O insecticida diflubenzuron [1-(4-clorofenil)3-(2,6-difluorobenzoí)ureia, actua como inibidor do processo de deposição cuticular em larvas de insectos (Mulder e Gijswijt, 1973). Este e outros productos químicos semelhantes interferem na síntese da quitina, necessária à formação do exosqueleto nos insectos, tornando a cutícula de tal modo deficiente que se torna mecanicamente frágil durante a muda (Post *et al.*, 1974; Hunter e Vincent, 1974; Marks e Sowa, 1976; Clarke *et al.*, 1977; Van Eck, 1979). O diflubenzuron têm sido proposto como uma potencial alternativa aos insecticidas mais persistentes (Schaefer e Dupras, 1976) podendo eventualmente ser usado tanto em meios terrestres como aquáticos (Julin e Sanders, 1978). A sua persistência embora limitada, devido à hidrólise e à absorção pelas matérias orgânicas (Schaefer e Dupras, 1976) causou, contudo, efeitos letais e subletais em grupos para os quais não se destinava, como por exemplo os crustáceos (Miura e Takahashi, 1974; Cunningham, 1976; Christiansen *et al.*, 1978; Costlow, 1979; Gulka *et al.*, 1980; Cunnigham *et al.*, 1985; Cunningham e Myers, 1987; Weis *et al.*, 1987; Weis e Ma, 1987). Os crustáceos larvares e adultos apresentavam deformações e uma alta mortalidade a concentrações de 0.5 µg/l e 100-200 µg/l respectivamente (Nimmo *et al.*, 1980; Cunnigham, 1976; Cardinal *et al.*, 1979) que aparentemente se deveram à incapacidade de ultrapassarem a fase de muda.



O diflubenzuron poder ser activo num outro grupo de animais aquáticos, os moluscos, que, segundo Mann (1988), apresentam uma matriz quitinosa na camada lamelar da concha. Segundo Beedham (1954) e de acordo com o Capítulo II verifica-se que a quitina é realmente uma componente da matriz da concha de *A. cygnea*. Neste capítulo examinaremos os efeitos de diflubenzuron neste molusco de água doce. As lagoas, onde estes animais bênticos se encontram, podem eventualmente ser contaminadas por diflubenzuron, lançado sobre os campos de cultura vizinhos. O objectivo deste capítulo será o de avaliar os efeitos de toxicidade directa e de observar as alterações na formação da concha de *A. cygnea* quando submetida à acção de diflubenzuron.

#### 1-Materiais e métodos

Utilizou-se o diflubenzuron (Dimilin PH 60-40) com a concentração original de 95% e sob a forma de pó solúvel (25%) fornecido pela Philips-Duphar. Não foi utilizado qualquer solvente orgânico sendo directamente adicionado na água.

Realizou-se uma experiência preliminar com oito animais num aquário a que adicionou gradualmente diflubenzuron (1, 5, 50 e de 150 mg/l) durante um mês (uma semana para cada concentração) a fim de se testar a existência de alguns efeitos toxicológicos que pudessem ser directamente visíveis a estes níveis. Como os animais toleraram o diflubenzuron, iniciou-se então um período experimental. Um grupo de 8 animais foi tratado em tanques onde o diflubenzuron foi previamente suspenso, com agitação, em 10 l de água a uma concentração de 200 mg/l. Um outro grupo de 8



animais foi conservado em água sem diflubenzuron, como control. Tanto nas condições experimentais como de control a água foi arejada à temperatura de cerca de 19°C e a um pH 6.5-7. Como única fonte de alimentação para estes animais utilizaram-se cerca de 200 g de sedimento, removido do meio natural, antes da suspensão de diflubenzuron. As experiências principiaram nos finais do mês de Julho mantendo-se sempre todas as condições iniciais, apenas agitando diariamente a água e os sedimentos. Este período foi escolhido, porque corresponde ao período de formação da concha e consequentemente ao período de segregação da matriz orgânica.

Após de três meses (Novembro) de tratamento com diflubenzuron fixaram-se fragmentos do epitélio extrapaleal em reagente Bouin para microscopia óptica. Após parafinação dos fragmentos efectuaram-se cortes e coraram-se pelo reagente Schiff em ácido periódico (Gabe, 1968). Realizou-se também a hidrólise enzimática do glicogénio pela amilase salivar (Gabe, 1968) noutros cortes, antes da coloração pelo reagente Schiff.

Os estudos morfológicos foram concluídos através da observação da face interna da concha com um microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-35C operado a 25 Kv. Os fragmentos foram montados em suportes de alumínio com uma pintura de prata condutora cobrindo-se posteriormente com uma camada delgada de ouro.

Os estudos morfológicos e citoquímicos foram sempre realizados em animais experimentais e de control.



## 2-Resultados

Não houve mortalidade nos animais tratados com diflubenzuron, quer nas experiências preliminares com uma concentração ("nominal") gradual de 1-150 mg/l quer em experiências efectivas com a concentração ("nominal") de 200 mg/l. Os animais tinham aparência normal em ambas as situações. Um dos sinais mais significativos correspondia à força com que uniam as valvas quando eram perturbados.

As observações citoquímicas das células secretoras do EEM, de animais mantidos em meio com a concentração "nominal" de 200 mg/l, mostraram uma reacção claramente positiva ao reagente Schiff. Esta reacção foi ainda positiva mesmo depois de ser submetida à hidrólise enzimática pela amilase (Fig. IX.1). Obtiveram-se resultados idênticos em animais de control.

Os estudos morfológicos mostraram que a face interna das conchas de animais control era formada por uma superfície calcária com três camadas de cristalização simultânea sendo a camada mais profunda, de aspecto compacto, totalmente completa (Figs IX.2 e IX.3). Pelo contrário, a face interna das conchas de animais tratados com diflubenzuron na concentração "nominal" de 200 mg/l apresentava uma superfície com um número maior de camadas de cristalização (mais do que três) formando uma estrutura muito desintegrada (Figs IX.4-6).

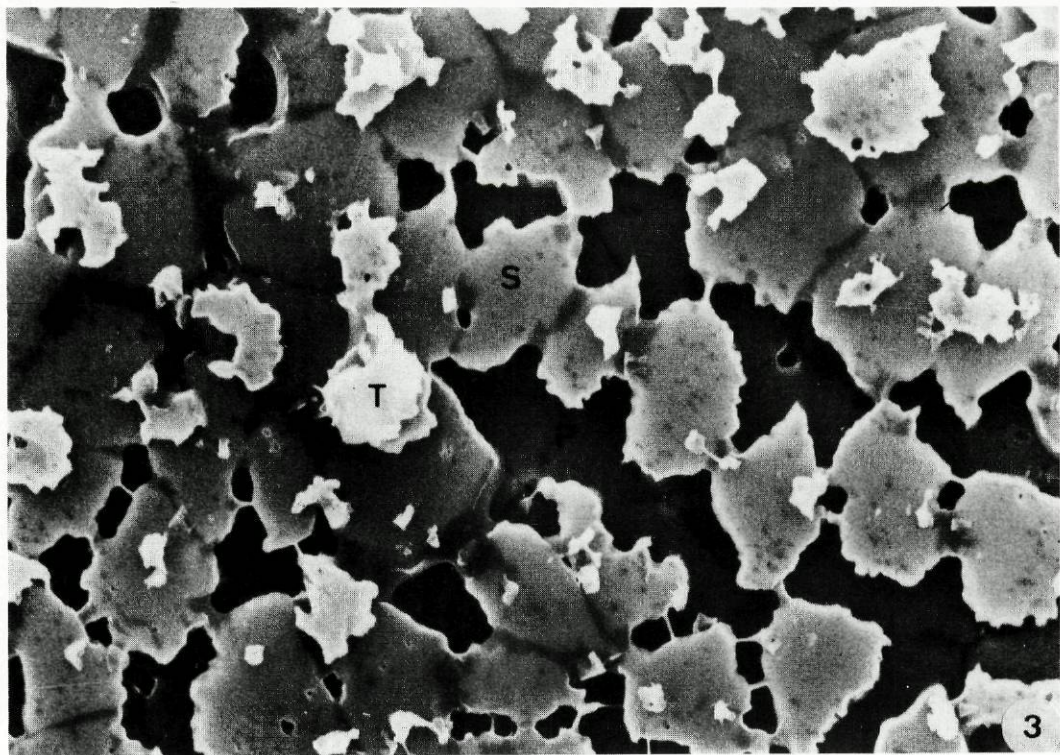
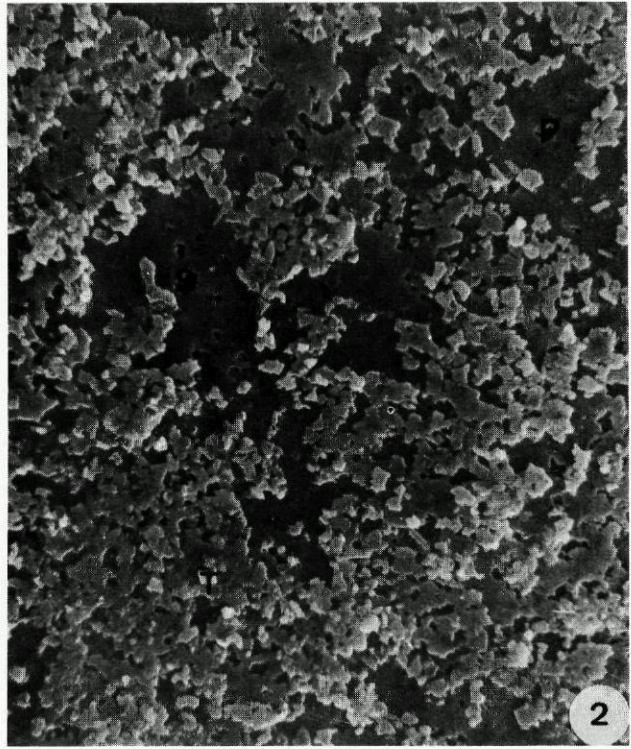
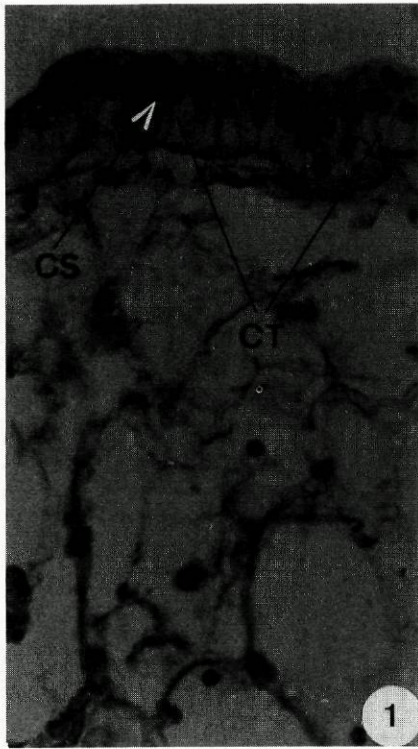
Este aspecto típico de desagregação resulta da ausência de fusão entre os vários cristais em crescimento. Em algumas áreas, a calcificação não se chegou mesmo a processar criando grandes interrupções ("buracos") na camada calcárea (Fig. IX.4). As su-



Fig. IX.1 - Coloração pelo reagente Schiff depois da digestão do glicogénio pela amilase no EEM de um animal tratado com diflubenzuron. Células secretoras (CS); Células epiteliais típicas (CT). x625.

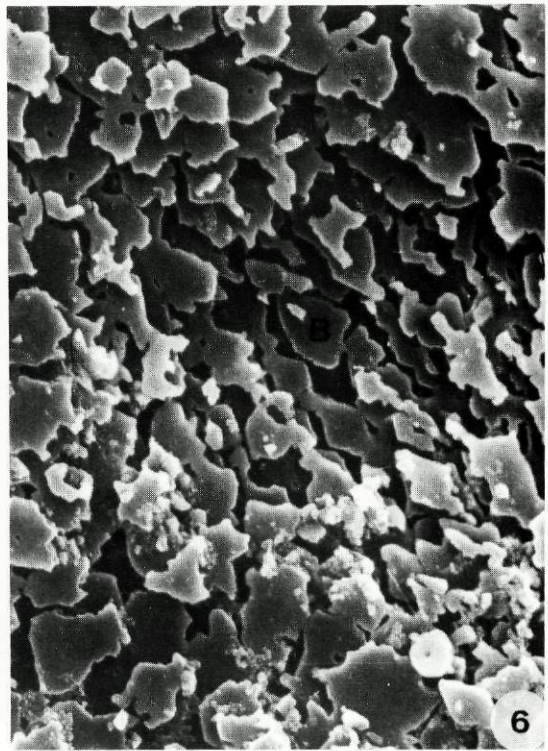
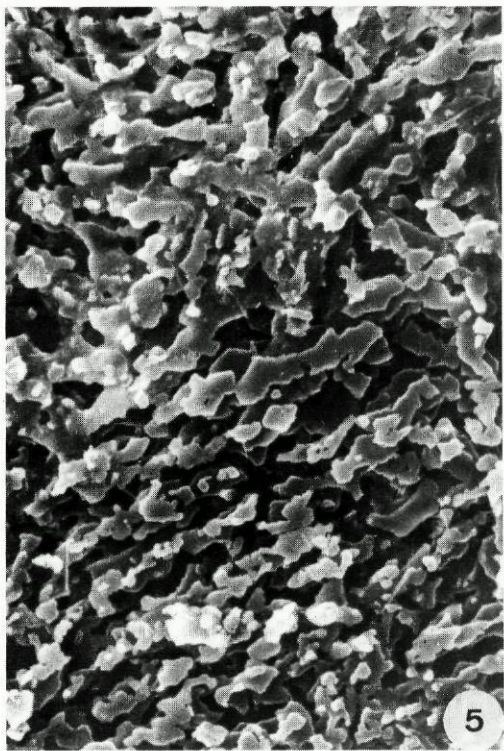
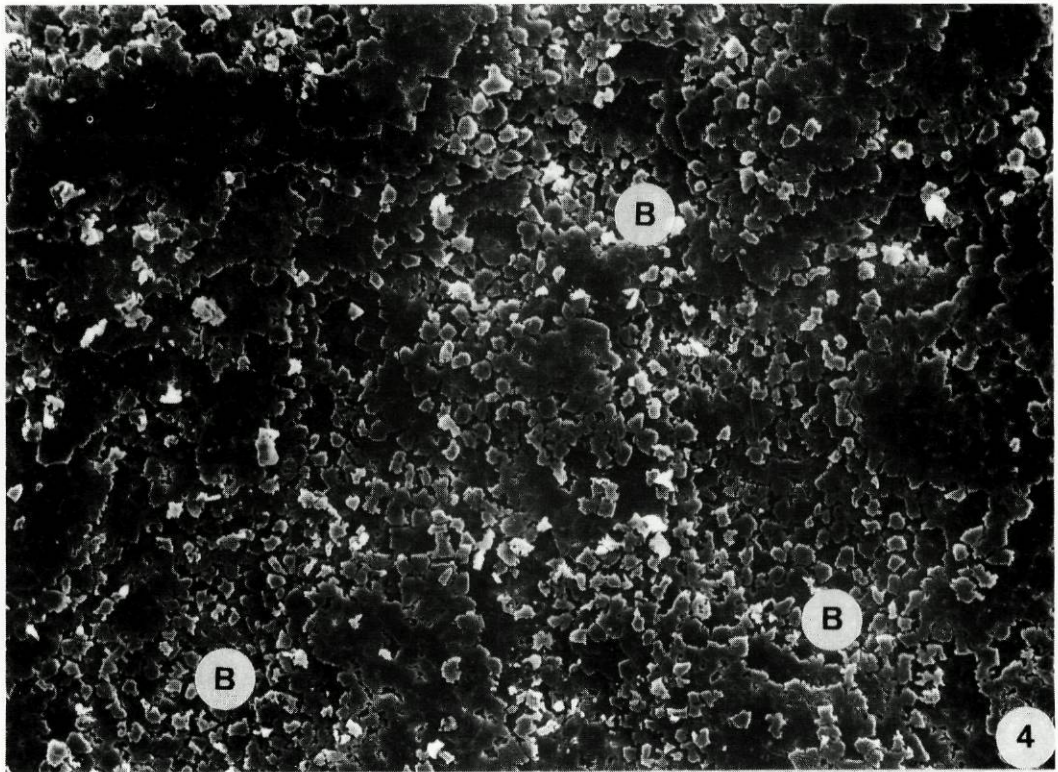
Fig. IX.2 - Face interna da concha de um animal control com as suas três camadas normais, ao microscópio electrónico de varrimento. Primeira camada (P); Segunda camada (S); Terceira camada (T). x2.500.

Fig. IX.3 - Ampliação das três camadas normais de calcificação. Primeira camada (P); Segunda camada (S); Terceira camada (T). x15.000.





Figs IX.4, IX.5 e IX.6 - A face interna da concha de um animal tratado com diflubenzuron durante três meses. 4) Existência de mais de três camadas formando "buracos" (B) em algumas zonas. 5) e 6). Ampliações da região B onde se observam cristais calcários muito desagregados. x2.150; x9.000; x9.000.





perfícies calcárias dos animais control e dos tratados com diflubenzuron apresentavam cristais de  $\text{CaCO}_3$  com formas irregulares (Figs IX.2-6).

### 3-Discussão

A exposição ao diflubenzuron causa profundas alterações na estruturas cuticulares daí resultando uma cutícula tão frágil que se rompe durante a muda nos insectos e nos crustáceos (Mulder e Gijswijt, 1973; Miura e Takahashi, 1974; Cunningham, 1976; Gulka *et al.*, 1980; Cunnigham *et al.*, 1985; Cunningham e Myers, 1987; Weis *et al.*, 1987; Weis e Ma, 1987). Segundo Post *et al.*, (1974), o DU 19111 [1-(2,6-diclorobenzoíl)-3-(3,4-diclorofenil)-ureia] inibe a síntese de quitina cuticular. Estes autores demonstraram que a união de unidades de N-acetilglucosamina para a formação de cadeias de quitina se rompe. O resultado final é a acumulação de quantidades relativamente grandes de N-acetilglucosamina.

O diflubenzuron (Dimilin, PH 60-40) produz idêntica alteração na síntese de quitina na cutícula de insectos (Post *et al.*, 1974; Hunter e Vincent, 1974 e Clarke *et al.*, 1977). Post *et al.*, (1974) referiram que não ocorre nenhuma acumulação virtual de N-acetilglucosamina, mas que outros metabolitos não identificados se poderão formar. Embora dependendo de futura confirmação, estes resultados sugerem que o diflubenzuron afectará a reacção de policondensação durante a formação da quitina bloqueando provavelmente a quitina sintetase por completo (Post *et al.*, 1974).

As presentes observações morfológicas ao microscópio electró-



nico de varrimento mostraram diferenças nítidas entre as conchas de animais tratados com diflubenzuron e de animais control relativamente à formação da camada lamelar. Com efeito, as conchas de animais control apresentavam normalmente três planos de calcificação sendo a camada mais profunda totalmente compacta. Ao contrário, a superfície calcária de animais em situação experimental apresentavam um aspecto alterado com numerosos cristais calcários desligados tanto em extensão como em profundidade originando várias camadas de calcificação pouco coesas. Em determinadas zonas esta separação dos cristais calcários é acentuada formando como que "buracos".

O aspecto de calcificação desagregada verificada na situação experimental sugere que as reacções de policondensação para a formação da quitina, normalmente presente na matriz orgânica da concha de *A. cygnea* (Beedham, 1954; Capítulo II) foram afectadas pelo diflubenzuron. Os resultados obtidos nas condições experimentais são portanto explicáveis, uma vez que a matriz orgânica é iniciadora e reguladora dos processos de cristalização (Wilbur, 1976, 1984; Wilbur e Simkiss, 1979; Crenshaw, 1982; Krampitz *et al.*, 1983; Mann, 1983; Weiner *et al.*, 1983; Greenfield *et al.*, 1984 e Wheeler e Sikes, 1984). Se esta matriz quitinosa reguladora modifica a sua textura devido à actuação de diflubenzuron, isto causará uma desorganização na estrutura das camadas calcárias ainda que a nucleação e o crescimento do cristal possam ocorrer. A redução no comprimento das cadeias de quitina e/ou a redução na coesão lateral entre elas, sugerido por Clarke *et al.* (1977) para a cutícula dos insectos, podem aqui também serem factores preponderantes na desorganização da estrutura calcária.



Os resultados citoquímicos obtidos indicam que, pelo menos, um composto muito semelhante à quitina possa ser sintetizado nas células secretoras do EEM de animais tratados com diflubenzuron. Com efeito, a coloração positiva pelo reagente Schiff e a reacção negativa à digestão pela amilase são idênticas às descritas no Capítulo II. Contudo, os resultados morfológicos obtidos indicam que esse composto quitinoso se apresenta muito provavelmente numa forma instável e não polimerizada (monómeros).

A ausência de mortalidade e a presença de um comportamento aparentemente normal, por parte de todos os animais tratados com o produto, são bons indícios de que diflubenzuron não é muito tóxico para estes animais, pelo menos à concentração máxima "nominal" de 200 mg/l. Se tivermos em conta que este molusco de água doce é um animal bêntico e que o diflubenzuron tende a aderir ao sedimento e acumular mais rapidamente após a sua alimentação, poder-se-á dizer que esta espécie é muito tolerante ao diflubenzuron. Isto torna-se mais evidente se compararmos as concentrações de 100-200 µg/l, usadas em crustáceos adultos (Cunningham, 1976; Cardinal, *et al.*, 1979; Gulka *et al.*, 1980), com as concentrações usadas nesta experiência. Contudo, uma exposição mais persistente (durante vários períodos de calcificação) ao diflubenzuron poderá eventualmente tornar a concha frágil e quebradiça. Isto causará uma grande incapacidade de inserção e ligação dos músculos adutores e outras regiões do organismo à concha, conduzindo a uma completa desprotecção do animal.

#### 4-Sumário

4.1 - Em animais tratados com diflubenzuron, colorações positivas pelo reagente Schiff e reacções negativas à hidrólise enzimática pela amilase no EEM mostram células secretoras de um composto quitinoso.

4.2 - Estudos morfológicas da superfície interna da concha revelam que o processo de calcificação está claramente alterado sugerindo que a secreção deste composto ocorre sob a forma não polimerizada.

4.3 - Estas observações parecem indicar na generalidade que se trata apenas de monómeros de quitina.

4.4 - Não se verificou qualquer efeito tóxico directo por parte de diflubenzuron na concentração de 200 mg/l.



## CAPÍTULO X

### CONCLUSÕES

1 - O manto de *A. cygnea* é um folheto que reveste a parte interna da concha circunscrevendo uma cavidade em torno do corpo do animal e é constituído por dois epitélios simples ligados entre si por um tecido conjuntivo onde se encontram grânulos calcários de pequenas dimensões (cerca de 1  $\mu$ m). O epitélio que reveste a face interna da concha (EEM) é constituído por células colunares de dois tipos: um secretor de quitina e outro mais numeroso que liberta grande quantidade de pequenas vesículas para a cavidade extrapaleal. O epitélio que reveste a cavidade intrapaleal tem dois tipos de células achatadas: um tipo secretor de mucopolissacarídeos sulfatados pouco ácidos com proteoglicanos e outro secretor de uma associação destes com um mucopolissacarídeo neutro. Existe um terceiro tipo de células, indiferenciadas, de forma colunar. As secreções do epitélio extrapaleal estarão muito provavelmente relacionadas com a produção da concha enquanto que as do epitélio intrapaleal talvez regulem as trocas de água e de solutos com o meio externo.

2 - O epitélio externo do manto gera "in situ" um potencial transepitelial que também pode ser observado quando isolado e montado "in vitro" (em câmaras de tipo Ussing). Nestas condições experimentais o potencial transepitelial pode atingir valores de 40 mv (lado da concha mais positivo) quando a preparação é banhada por uma solução contendo concentrações de cálcio mais



mais baixas (1 mM) e de potássio mais altas (7 mM) que as medidas na hemolinfa ou no líquido extrapaleal, respectivamente de 6 mM e 1mM. Em condições de curto-circuito a barreira basolateral do EEM é mais permeável que a barreira apical aos diferentes iões sendo o potencial intracelular fundamentalmente sensível às mudanças da concentração de potássio e cloro na hemolinfa. Houve quedas de 67 e 92% na corrente de curto-circuito quando a solução que banha o lado apical do epitélio foi respectivamente gazificada com oxigénio a pH 7.2 e 4.5 ou de 88% quando gasificada com carbogénio nominalmente sem bicarbonato. A adição de DIDS, SITS e amiloride causou a inibição da corrente de curto-circuito de uma forma mais ou menos acentuada quando adicionados do lado da hemolinfa não ocorrendo nenhuma alteração com a adição da ubaína. A corrente foi também inibida pelo DNP, iodicetamida e diamox. Os fluxos líquidos de potássio (rubídio), cloro e cálcio foram negligíveis quando comparados com a corrente de curto-circuito. Foi encontrado um pequeno fluxo líquido de sódio em direção ao lado da hemolinfa e um fluxo líquido de bicarbonato que correspondeu a um fluxo de carga igual à corrente de curto-circuito e que foi inibido por DIDS. A permeabilidade ao cálcio foi uma ordem de grandeza mais elevada que as permeabilidades ao sódio, potássio ou cloro. Concentrações de cloro e de potássio intracelular determinadas com microeléctrodos sensíveis a iões ou com métodos químicos mostraram valores acima dos respectivos valores de equilíbrio. A associação entre os fluxos de bicarbonatos e de cloro ficou demonstrada pelo aumento da concentração de cloro quando se removeu bicarbonato do lado da hemolinfa. A calcificação da concha resulta provavelmente do balanço entre uma difusão



simples de cálcio para o compartimento extrapaleal quando se cria um gradiente electroquímico favorável para este ião e o movimento igualmente passivo de cálcio que resulta do transporte contra gradiente de iões bicarbonato realizados pelo epitélio. O balanço entre estes dois processos pode explicar as variações cíclicas da mineralização ao longo do ano.

3 - Em condições de curto-circuito o epitélio extrapaleal produziu uma acidificação do compartimento extrapaleal e uma alcalinização do compartimento hemolinfático segundo uma taxa de secreção que foi idêntica em valor numérico à corrente de curto-circuito simultaneamente medida em condições estacionárias. Tanto a corrente de curto-circuito como a secreção de ácido e de base foram igualmente inibidos pela anóxia, diamox, DIDS (do lado da hemolinfa), DNP e iodocetamida. A corrente de curto-circuito foi sensível às concentrações de  $\text{CO}_2$ , bicarbonato e protões no compartimento extrapaleal e insensível ao vanadato e oligomicina, mas lentamente inibida pelo DCCD adicionado sob anóxia e quase totalmente inibida em poucos segundos pelo TBTO. Isto sugere que a corrente de curto-circuito é devida à troca de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  com recirculação de  $\text{Cl}^-$  através da membrana basolateral e à operação duma bomba electrogénica de protões na membrana apical.

4 - Tendo em conta que durante a maior parte do ano as preparações epiteliais geravam correntes de curto-circuito baixas surgiu a necessidade de melhorar as condições de estudo. A pré-incubação do epitélio extrapaleal do lado da hemolinfa com uma solução contendo succinato a pH 4 durante 15 minutos e com temperaturas



acima de 15°C seguida de uma incubação com succinato a pH 7 induziu uma estimulação da corrente de curto-circuito de cerca de dez vezes. Depois do período de incubação o succinato deixou de ser necessário para a manutenção da corrente durante muitas horas. A corrente foi inibida pelo DNP, iodicetamida e diamox. Obtiveram-se estimulações idênticas com citrato, fumarato,  $\alpha$ -cetoglutarato e malato. Isto sugere que as variações cíclicas da corrente de curto-circuito ao longo do ano, elevadas no verão-outono e baixas no inverno-primavera, se deve provavelmente às alterações no teor de succinato e outros substratos nas células extrapalpeais.

5 - A ausência de um transporte transmembranar específico para os íons cálcio no sentido da concha tornou difícil a compreensão dos mecanismos de calcificação da concha pelo que desenvolvemos um estudo sobre as condições ideais para a mobilização de cálcio no sentido da concha. Deste modo, verificou-se que em meio ácido o pH interno dos animais é ligeiramente mais baixo, a concentração de cálcio livre é mais elevada e há uma redução de grânulos calcários no manto e uma intensa deposição de cálcio. Estes parâmetros traduzem no seu conjunto uma forte mobilização das reservas internas de cálcio para a concha em condições de acidose. Esta situação reproduz-se muito provavelmente "in vivo" no período de primavera-verão quando a calcificação é mais intensa devido a uma acidose metabólica. Nos animais mantidos em meio alcalino verificou-se um aumento no número de grânulos calcários do manto. Esta situação ocorre "in vivo" no período outono-inverno, altura em que muito provavelmente haverá uma subida dos



níveis de pH do meio interno do animal devido a um aumento natural de oxigenação do meio externo e de um transporte mais intenso de bicarbonatos para a hemolinfa.

6 - No que se refere à estruturação da camada nacarada da concha os estudos feitos revelam a presença de cristais de aragonite e de  $\alpha$ -quitina formando dois componentes importantes no processo de calcificação. A estrutura ortorrômbica destes compostos com tendência para uma forma mais estável, a idêntica distância reticular dos planos {110} e a textura lamelar destes dois compostos sugerem uma forte afinidade entre eles podendo mesmo admitir-se um fenómeno de epitaxia. Nas observações ao microscópio electrónico de varrimento da superfície interna da concha encontraram-se cristais de  $\text{CaCO}_3$  com formas geométricas que variam ao longo do ano. As formas mais irregulares ocorreram na primavera e verão e as mais regulares no outono e inverno. Esta variabilidade de formas depende fundamentalmente da concentração de cálcio no líquido extrapaleal que será um resultado das variações cíclicas de pH que ocorrem simultaneamente em sentidos inversos na hemolinfa e no líquido extrapaleal.

7 - O estudo do efeito de alguns poluentes (TBTO e Diflubenzuron) permitiu reforçar algumas sugestões já apontadas, relativas à deposição e estruturação da concha. Com efeito, o tratamento com baixas concentrações de TBTO ( $0.2 \mu\text{g/l}$ ) provocou "in vivo" um aumento da taxa de calcificação da concha provavelmente devido à sua actuação ao nível da bomba de protões na membrana apical, provocando uma alcalinização do meio extrapaleal o que favorece

a deposição de carbonato de cálcio. O tratamento "in vivo" com Diflubenzuron causou uma desintegração profunda das camadas nacaradas da concha devido provavelmente a uma intensa deformação da matriz orgânica quitinosa que nestas circunstâncias se apresentará sob a forma de monómeros.



## BIBLIOGRAFIA

- Abolins-Krogis A. (1961a) The histochemistry of the hepatopancreas of *Helix pomatia* L. in relation to the regeneration of the shell. *Arkiv. Zool.* 13, 159-201.
- Abolins-Krogis A. (1961b) The histochemistry of the mantle of *Helixpomatia* (L.) in relation to the repair of damaged shell. *Ark. Zool.* 15, 461-473.
- Abolins-Krogis A. (1963). The histochemistry of the mantle of *Helix pomatia* (L.) in relation to the repair of the damaged shell. *Arkiv. Zool.* 15, 461-474.
- Akberali H.B., Marriott K.R.M. and Trueman E.R. (1977) Calcium utilization during anaerobiosis induced by osmotic shock in a bivalve mollusc. *Nature* 266, 852-853.
- Alzieu C. (1981) Evaluation des risques dus a l'emploi des peintures antisalissures dans les zones conchylicoles. Anomalies de calcification. Theme Surveillance continue Mecanisme d'action des polluants. Addendum du rapport due 15 juin 1981. *Institut Scientifique et Technique des Peches Maritimes*. Nates le 15 decembre 1981.
- Alzieu C., Heral M., Thibaud Y., Dardignac M.J. and Feuillet M. (1982) Influence des peintures antisalissures a base d'organostaniques sur la calcification de la coquille d'huitre *Crassostrea gigas*. *Rev. Trav. Inst. Pech. Marit.* 45, 101-116.
- Alzieu C., Thibaud Y., Heral M. and Boutier B. (1980) Evaluation des risques dus a l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Rev. Trav. Inst. Pech. Marit.* 44, 301-349.
- Amhed T.A. and Chaplin A.E. (1979) Seasonal variation in the anaerobic metabolism of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 64B, 351-356.
- Beaumont A. and Cassier P. (1981) *Biologie Animal*, Tome I. Paris: Bordas.
- Beedham G.E. (1954) Properties of the non-calcareous material in the shell of *Anodonta cygnea*. *Nature* 174, 750

- Beedham G.E. (1958) Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Q. Jl. Microsc. Sci.* 99, 181-197.
- Becker G.L., Chen C., Greenawalt J.W. and Lehninger A.L. (1974) Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Cell Biol.* 61, 316-326.
- Benos D.J. (1982) Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am. J. Physiol.* 242, c131-145.
- Bernhardt A.M., Manyak D.M. and Wilbur K.M. (1985) "In vitro" recalcification of organic matrix of scallop shell and serpulid tubes. *J. Mollusc. Stud.* 51, 284-289.
- Biedermann W. (1902a) Untersuchungen über bau entstehung der Molluskenschalen. *Jena. Z. Naturw.* 36(29), 1-164.
- Biedermann W. (1902b) Über die bedeutung von kristallizationsprozessen bei der bildung der skelette wirbelloser Tiere, namentlich der Molluskenschalen. *Z. allg. Physiol.* 1, 154-208.
- Bierbauer J. (1957) Untersuchungen über die regeneration und histologie von *Helix pomatia*. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 7, 419-431.
- Blackwell J.F., Gainey L.F. and Greenberg M.J. (1977) Shell ultrastructure in two subspecies of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* (Dillwyn, 1817). *Biol. Bull.* 152, 1-11.
- Bloom W. and Fawcett W. (1975) *A Textbook of Histology*. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders.
- Boggild O.B. (1930) The shell structure of the molluscs. *Kgl. danske Vidensk. Selsk. Skr., Naturvidensk. math. Afd.* (9) 2 (2), 231-325.
- Boron W.F. (1983) Transport of  $H^+$  and of ionic weak acids and bases. *J. Membr. Biol.* 72, 1-16.
- Boron W.F. (1986) Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Ann. Rev. Physiol.* 48, 377-388.
- Burton R.F. (1970) Tissue buffering in the snail *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 37, 193-203.
- Burton R.F. (1972) The storage of calcium and magnesium phosphate and of calcite in the digestive glands of the pulmonata (Gastropoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 43A, 655-663.



- Burton R.F. (1976) Calcium metabolism and acid-base balance in *Helix pomatia*. In *Perspectives in Experimental Biology* (ed. D.P. Spencer) Oxford: Pergamon Press.
- Burton R.F. (1983) Ionic regulation and water balance. In *The Mollusca* Vol.5 (ed. K.M. Wilbur and A.S.M. Saleuddin) pp. 291-341. New York: Academic Press.
- Cardinal H., Vernet G. and Sinegre G. (1979) Quelques effets d'un inhibiteur de croissance: le diflubenzuron sur un crabe *Carcinus mediterraneus* (Czerniavsky). *CR. Soc. Biol. Sess. Fil.* 173, 1105-1108 .
- Carlinsky, N.J. and Lew V.L. (1970) Bicarbonate secretion and non-Na component of the short-circuit current in the isolated colonic mucosa of *Bufo arenarum*. *J. Physiol., Lond.* 206, 529-541.
- Carlstrom D. (1957) The crystal structure of  $\alpha$ -chitin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 669-683.
- Cerejido M. and Rotunno C. (1970) *Introduction to the Study of Biological Membranes*. New York, London, Paris: Gordon and Breach Science Publishers.
- Chaisemartin C., Martin P.N. and Bernard M. (1970) Espaces et clearances inuliniques comparés chez les mollusques dulcaquicoles. *C. R. Seances Soc. Biol.* 164, 877-880.
- Champbel J.W. and Boyan B.D. (1976) On the acid-base balance of gastropod molluscs. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (ed. N. Watabe and K.M. Wilbur) pp. 109-133 Columbia: Univ. of South Carolina Press.
- Christiansen M.E., Costlow J.D. and Monroe R.J. (1978) Effects of the insect growth regulator Dimilin (TH 6040) on larval development of two estuarine crabs. *Mar. Biol.(Ber)* 50, 29-36.
- Clarke L., Temple G.H.R. and Vincent J.F.V. (1977) The effects of a chitin inhibitor-Dimilin on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.* 23, 241-246.
- Cooperstein I.L. and Hogben C.A.M. (1959) Ionic Transfer across the isolated frog large intestine. *J. gen. Physiol.* 198, 461-473.
- Costlow J.D. (1979) Effect of dimilin on development of larvae of the stone crab *Menippe mercenaria* and the blue crab *Callinectes sapidus*. In *Marine*



- Pollution: Functional Responses* (ed. W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg, F.J. Vernberg) pp. 355-364. New York: Academic Press.
- Crenshaw M.A. (1972a) The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *Biol. Bull. mar. biol. lab., Woods Hole* 143, 506-512.
- Crenshaw M.A. (1972b) The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biom mineralization* 6, 6-11.
- Crenshaw M.A. (1982) Mechanisms of normal biological mineralization of calcium carbonates. In *Biological Mineralization and Demineralization* (ed. G.H. Nancollas) pp. 243-257. Berlin: Springer-Verlag.
- Crenshaw M.A. and Ristedt H. (1976) Histochemical localization of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius* L. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (ed. N. Watabe and K.M. Wilbur) pp. 355-367. Columbia: Univ. of South Carolina Press.
- Cunningham P.A. (1976) Effects of Dimilin (TH-6040) on reproduction in the brine shrimp *Artemia salina*. *Environ. Entomol.* 5, 701-706.
- Cunningham P.A. and Myers L.E. (1987) Effects of diflubenzuron (Dimilin) on survival, molting, and behavior of juvenile fiddler crabs, *Uca pugilator*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16(6), 745-752.
- Cunningham P.A., Wilson J.E., Evans D.W. and Costlow J.D. (1985) Effects of sediment on the persistence and toxicity of diflubenzuron (Dimilin) in estuarine waters: a laboratory evaluation using larvae of two estuarine crustaceans. In *Pollution Physiology of Estuarine Organisms* (ed. W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg, F.J. Vernberg) pp. 299-331. Columbia, SC: Univ of S. Carolina Press.
- Dawydoff C. (1928) Development des lamellibranches. In *Traité d'Embryologie Comparé des Invertébrés*. Paris: Masson.
- Deaton L.E. (1982) Tissue (Na+K)-activated adenosinetriphosphatase activities in fresh water and brackish water bivalve mollusc. *Mar. Biol. Letts* 3, 107-112.
- Degens E.T. (1976) Molecular mechanisms on carbonate, phosphate, and silica deposition in the living cell. *Top. Curr. Chem.* 64, 1-112.
- De Waele A. (1930) Le sang d'*Anodonta cygnea* et la formation de le coquille. *Mém. Acad. R. Belg.* 10, 1-15.



- de Zwaan A. (1977) Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. *Oceanogr. Mar. Biol. Rev.* 15, 103-107.
- Dixon M. and Webb E.C. (1964) *Enzymes*. pp. 341-342. London: Longmans.
- Dogterom A.A. and Jentjens T. (1980) The effect of the growth hormone of the pond snail *Limnaea stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol.* 66A, 687-690.
- Dogterom A.A., van Loenhout H. and van der Schors R.C. (1979) The effect of the growth hormone of *Limnaea stagnalis* on shell formation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39, 63-68.
- Dogterom A.A. and van der Schors R.C. (1980) The effect of the growth hormone of *Limnaea stagnalis* on (bi)carbonate movements, especially with regard to shell formation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 334-339.
- Dotterweich H. and Elssner E. (1935). Die mobilisierung des schalenkalkes für die reaktionsregulation der muscheln (*Anodonta cygnea*). *Biol. Zbl.* 55, 138-161.
- Dugal L.P. (1939) The use of calcareous shell to buffer the product of anaerobic glycolysis in *Venus mercenaria*. *J. Cell Comp. Physiol.* 13, 235-251.
- Durning W.C. (1957). Repair of a defect in the shell of the snail *Helix aspersa*. *J. Bone and Joint Surg.* 39A, 377-393.
- Edsall J.T. and Wyman J. (1958) *Biophysical Chemistry*, vol. 1. New York: Academic Press.
- Ehrenfeld J., Garcia-Romeu F. and Harvey B.J. (1985) Electrogenic active proton-pump in *Rana esculenta* skin and its role in sodium ion transport. *J. Physiol. Lond.* 359, 331-355.
- Ferreira H.G. and Marshall M. W. (1985) *The Biophysical Basis of Excitability*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Fischer J.I., Husted R.F., and Steinmetz P.R. (1983) Chloride dependence of the HCO<sub>3</sub> exit step in urinary acidification by The turtle bladder. *Am. J. Physiol.* 245, F564-F568.
- Florkin M. and Houet R. (1938) Concentration de l'ammoniaque "in vivo" et "in vitro" dans le milieu interieur des invertébrés. I. L, *Anodonte*. *Arch. Intern. Physiol.* 47, 125-131.

- Fraenkel G. and Rudall K.M. (1940) A study of the physical and chemical properties of the insect cuticle. *Pro. roy. Soc. (B)* 129, 1-35.
- Fraenkel G. and Rudall K.M. (1947) The structure of the insect cuticles. *Proc. roy. Soc. (B)* 134, 111-143.
- Franc A. (1960) Classe des bivalves. In *Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie* Tome V, Fasc. II (ed. P.P. Grassé) pp. 1845-2164. Paris: Masson et C<sup>ie</sup>.
- Frasson L.A. (1987) Structure and function of cel-associated proteoglycans. *Tibs* 12, 406-411.
- Frémy E. (1855) Recherches chimiques sur les os. *Annls Chim. Physiol.* 43, 47-107.
- Gabbot P.A. (1983) Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In *The Mollusca* Vol. 2 (ed. K.M. Wilbur and A.S.M. Saleuddin) pp. 165-207. New York: Academic Press.
- Gabe M. (1968) *Techniques Histologiques*. Paris: Masson.
- Gade G., Wilps H., Kluytmans J.H.F.M. and Zwaan A. (1975) Glycogen degradation and end products of anaerobic metabolism in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *J. Comp. Physiol.* 104, 79-85.
- Galhano M.H. and Silva M.T.F. (1983) The reproductive cycle of *Anodonta cygnea* (L.) from Mira lagoon (Portugal). *Publ. Inst. Zool. Dr. Augusto Nobre*, 179, 1-5.
- Galtsoff P.S. (1969) Anomalies and malformations in the shells of *Crassostrea virginica*. *Nat. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 575-380.
- Ganter P. Jolles G. (1969) *Histochimie Normal et Pathologique*. Paris: Gauthier-Villars.
- Garside J. (1982) Nucleation. In *Biological Mineralization and Demineralization* (ed. G.H. Nancollas) pp. 23-35. Berlin: Springer-Verlag.
- Geraerts W.P.M. (1976a) Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29, 97-108.
- Gouffeau A. and Boutry M. (1986) Three proton-pumping ATPases in yeast. *Microbiol. Sci.* 3, 164-168.



- Grassé P.P., Poisson A.R. and Tuzet O. (1970) Classe des bivalves ou lamelli-branches. In *Zoologie I. Invertébrés* (ed. P.P. Grassé, R.A. Poisson and O. Tuzet). Paris: Masson.
- Greenfield E.M., Wilson D.C. and Crenshaw M.A. (1984) Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. In *Symposium on the Mechanism of Calcification in Biological Systems* (ed. N. Watabe and M.A. Crenshaw) *Am. Zool.* 24, 925-932.
- Grégoire C.H. (1967) Sur la structure des matrices organiques des coquilles mollusques. *Biol. Rev.* 42, 653.
- Grégoire C., Duchâteau G. and Florkin M. (1955) La trame protidique des nacre et des perles. *Ann. Inst. Océanogr. (Paris)* [N.S.] 31, 1-36.
- Grinstein S. and Rothstein A. (1986) Mechanism of regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *J. Membr. Biol.* 90, 1-12.
- Guardabassi A. and Piacenza K.L. (1958) Le manteau de l'escargot *Helix pomatia*. Étude cytologique et histochimique. *Arch. Anat. Microscope Morphol. exptl.* 47, 25-46.
- Gulka G., Doscher C.M. and Watabe N. (1980) Toxicity and molt-accelerating effects of diflubenzuron on the barnacle, *Balanus eburneus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 477-481.
- Gupta A.S. (1977) Observations on the gill of *Viviparus bengalensis* in relation to calcium uptake storage. *Acta Zool.* 58, 129-133.
- Haas F. (1935) Bivalvia, II die schale, III der mantel. In *Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs* Vol. 3 (ed. H.G. Bronn) pp. 38-649.
- Hald A. (1952) *Statistical Theory with Engineering Applications* pp.391-394. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Hammen C.S. and Wilbur K.M. (1959) carbon dioxide fixation in marine invertebrates. I. The main pathway in the oyster. *J. Biol. Chem.* 234, 1268-1271.
- Hill R.B. and Welsh J.H. (1966) Heart, circulation and blood cells. In *Physiology of Mollusca* Vol. II (ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge) pp. 125-174. New York: Academic Press.
- Hirata A.A. (1953) Studies on shell formation. II. A mantle-shell preparation for "in vitro" studies. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 104, 398-407.



- Hochachka P.W. (1973) Comparative intermediary metabolism. In *Comparative Animal Physiology*, Vol. I (ed. C.L. Prosser) pp. 212-249. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Holwerda D.A. and Veenhof P.R. (1984) Aspects of anaerobic metabolism in *Anodonta cygnea* L.. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**, 707-711.
- Hotchkiss R.D. (1948) A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Archs Biochem.* **16**, 131-141.
- Hunter E. and Vincent J.F.V. (1974) The effects of a novel insecticide on insect cuticle. *Experientia* **30**, 1432-1433.
- Husted R.F., Cohen L.H. and Steinmetz P.R. (1979). Pathways for bicarbonate transfer across the serosal membrane of the turtle urinary bladder: studies with a disulfonic stilbene. *J. Membr. Biol.* **47**, 27-37.
- Istin M. (1970) Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium chez les lamellibranches. *Bulletin d'information scientifique e technique du Commissariat à l'énergie atomique*, **144**, 53-80.
- Istin M. and Girard J.P. (1970a) Dynamic state of calcium reserves in freshwater clam mantle. *Calc. Tissue Res.* **5**, 196-205.
- Istin M. and Girard J.P. (1970b) Carbonic anhydrase and mobilisation of calcium reserves in the mantle of lamellibranches. *Calc. Tissue Res.* **5**, 247-260.
- Istin M. Kirschner L.B. (1968) On the origin of the bioelectrical potential generated by the freshwater clam mantle. *J. gen. Physiol.* **51**, 478-496.
- Istin M. Maetz J. (1964). perméabilité au calcium du manteau de lamellibranches d'eau douce étudiée à l'aide des isotopes  $^{45}\text{Ca}$   $^{47}\text{Ca}$ . *Biochim. biophys. Acta* **88**, 225-227.
- Istin M. and Masoni A. (1973) Absorption et redistribution du calcium dans le manteau des lamellibranches en relation avec la structure. *Calc. Tiss. Res.* **11**, 151-162.
- Jodrey L.H. (1953) Studies on shell formation. III. Measurement of calcium deposition in shell and calcium turnover in mantle tissue preparation and  $^{45}\text{Ca}$ . *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* **104**, 398-407.



- Julin A.M. and Sanders H.O. (1978) Toxicity of the IGR, diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. *Mosquito News* 38 (2), 256-259.
- Kado Y. (1953) Distribution of polysaccharides in mantle tissue of *Venerupis semidecussata* (Bivalve). *J. Sci Hiroshima Univ. Ser. B, Div. I* 14, 259-264.
- Kawaguti S. and Ikemoto N. (1962). Electron microscopy on the mantle of a bivalve, *Fabulina nitidula*. *Biol. J. Okayama Univ.* 8, 21-30.
- Key D., Nunny R.S., Davidson P.E. and Leonard M.A. (1976) Abnormal shell growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Some preliminary results from experiments undertaken in 1975. *ICES Paper CM 1976/K:11 (mimeograph)*. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen.
- Kirschner L.B. and Sorenson A.L. (1964) Calcium movement across the isolated clam mantle. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 23, 115.
- Kirschner L. B., Sorenson A.L. and Kriebel M. (1960) Calcium and electrical potencial across the clam mantle. *Science*, 131, 755.
- Kitano Y. Kanamori N. and Tokuyama A. (1969) Effects of organic matter on solubilities and crystal form of carbonates. *Am. Zool.* 9, 681-688.
- Kitano Y., Kanamori N. and Yoshioka S. (1976) Influence of chemical species on the crystal type of calcium carbonate. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (ed. N. Watabe and K.M. Wilbur) pp. 191-202. Columbia: Univ. of South Carolina Press.
- Kniprath E. (1972) Formation on structure of the periostracum in *Lymnaea stagnalis*. *Calcif. Tiss. Res.* 9, 260-271.
- Krampitz G. Drolshagen H. Hausle J. and Hof-Irmscher K. (1983) Organic matrices of mollusc shells. In *Biomineralization and Biological Metal Accumulation* (ed. P. Westbroek and de F.W. Jong) pp. 231-247. Dordrecht HollandD: Reidel Publ. Co..
- Krampitz G., Engels J. and Cazaux C. (1976) Biochemical studies on water-soluble proteins and related components of gastropod shells. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (ed. N. Watabe and K.M. Wilbur) pp. 155-173. Columbia: Univ. of South Carolina Press.



- Kobayashi S. (1962) Personal communication.
- Laughlin R.B., French W. and Guard H.E. (1986) Accumulation of Bis(tributyltin)oxide by the Marine Mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* 20, 884-890.
- Lev R. and Spiecer S.S. (1964) Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 309.
- Leo A., Hansch C. and Elkins D. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71, 525-616.
- Lillie R.D. (1965) *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York: McGraw-Hill.
- Linnet P.E. and Beechey R.B. (1979) Inhibitors of the ATP synthetase system. In *Methods in Enzymology* Vol. IV (ed. S. Fleischer and L. Packer) pp. 172-511.
- Loest R.A. (1979a) Ammonia volatilization and absorption by terrestrial gastropods: A comparison between shelled and shell-less species. *Physiol. Zool.* 52, 461-469.
- Loest R.A. (1979b) Ammonia-forming enzymes and calcium carbonate deposition in terrestrial pulmonates. *Physiol. Zool.* 52, 470-483.
- Lowenstam H. (1981) Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126-1131.
- Lowenstein W.R. and Kanno (1967) Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J. Cell. Biol.* 33, 235-242.
- Lowenstein W.R. and Penn R.D. (1967) Intercellular communication and tissue growth. II. Tissue regeneration. *J. Cell. Biol.* 33, 235-242.
- Ludens J.H. and Fanestil D.D. (1972) Acidification of urine by isolated urinary bladder of toad. *Am. J. Physiol.* 233, 1338-1334.
- Maguire R.J., Chau Y.K., Bengert G.A., Hale E.J. Wong P.T.S. and Kramar O. (1982) Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers. *Environ. Sci. Technol.* 16, 698-702.
- Maguire R.J., Wong P.T.S. and Rhamey J.S. (1984) Accumulation and metabolism of Tri-n-butyltin Cation by a green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 537-540.
- Manigault P. (1933) La tension du gaz carbonique, condition de la régénération de la coquille chez les *Helix*. *Trav. Stat. Biol. Ann. Sci. Natur. Zool.* 20.



- Manigault P. (1939) Recherches sur le calcaire chez les mollusques. Phosphatase et precipitation calcique. *Histochimie du calcium. Ann. Inst. Oceanogr.* 18, 331-346.
- Manigault P. (1960) Coquille des mollusques: structure et formation. In *Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie*, Vol. 5 (2) (ed. P.P. Grassé). Paris: Masson.
- Mann S. (1983) Mineralization in biological systems. *Structure Bonding* 54, 125-174.
- Mann S. (1988) Molecular recognition in the biomineralization. *Nature* 332, 119-124.
- Maren T.H. (1967) Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.* 47, 595-781.
- Marks E.P. and Sowa B.A. (1976) Cuticle formation *in vitro*. In *The Insect Integument* (ed. H.R. Hepburn) pp. 339-350. Elsevier, Amsterdam: Elsevier.
- Martin A.W. (1961) The carbohydrate metabolism of the mollusca. In *Comparative Physiology of Carbohydrated Metabolism in Heterothermic Animals* (ed. A.W. Martin). Seattle, Washington: Univ. of Washington Press.
- Miura T. and Takahashi R.M. (1974) Insect development inhibitors. Effects of candidate mosquito control agents on non-target aquatic organisms. *Environ. Entomol.* 3, 631-636.
- Morton B. (1983) Feeding and digestion in Bivalvia. In *The Mollusca* Vol. 5 (ed. K.M. Wilbur and A.S.M. Saleuddin) pp. 65-131. New York: Academic Press.
- Mulder R. and Gijswijt M.J. (1973) The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pestic. Sci.* 4, 737-745.
- Mustafa T. and Hochachka P.W. (1971) Properties of pyruvate kinases in tissues of a marine bivalves. *J. Biol. Chem.* 246, 3196-3203.
- Mutvei H. (1969) On the micro and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs. *Stockholm Contrib. Geol.* 20, 1-17.
- Mutvei H. (1974) SEM studies on arthropod exoskeletons. Part 1: Decapod crustaceans, *Homarus gammarus* (L) and *Carcinus maenas* (L). *Bull. Geol. Instn.*



- Univ. Upsala, [N.S.] 4, 73-80.
- Nakahara H. (1962) Observation on the ingestion of carmine particles by mantle and sac epithelium of *Pinctada martensii*. *Bull. natn. Pearl Res. Lab.* 8, 879-883.
- Nakahara H. and Bevelander G. (1967) Ingestion of particulate matter by the outer surface cells of the mollusc mantle. *J. Morph.* 122, 139-146.
- Neff J.M. (1972) Ultrastructure of the outer mantle epithelium of the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to the calcification of the shell. *Tissue Cell* 4, 591-600.
- Newman W.F. and Newman M.W. (1958) *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*. Chicago, Illinois: Univ. of Chicago Press.
- Nimmo D.R., Hamaker T.L., Moore J.C. and Wood R.A. (1980) Acute and chronic effects of Dimilin on survival and reproduction of *Mysidopsis bahia*. In *Aquatic Toxicology*, STP 707 (ed. J.G. Eaton, P.R. Parrish and A.C. Hendricks) pp. 366-376. Philadelphia PA: American Society for Testing and Materials.
- Pearse A.G.E. (1953) *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London: Churchill.
- Poulíček M., Voss-Foucart M.F. and Jeuniaux Ch (1986) Chitinoproteic complexes and mineralization in mollusk skeletal structures. In *Chitin nat. technol. [Proc. int. Conf. chitin chitosan]* (ed. R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Gooday) pp. 7-12. New York: Plenum Press.
- Pon N.G. (1964) Expressions of the pentose phosphate cycle. In *Comparative Biochemistry*, vol.VII (ed. M. Florkin and S.H. Mason), p 391. New York: Academic Press.
- Potts W.T.W. (1954a) The inorganic composition of the blood of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea*. *J. Exp. Biol.* 31, 376-385.
- Post L.C., De Jong B.J. and Vincent W.R. (1974) 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-Phenylurea in insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pest. Biochem. Physiol.* 4, 473-483.
- Prosser C.L. (1983) *Comparative Animal Physiology* Vol. I. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company.



- Réaumur R. (1709) De la formation et de l'accroissement des coquilles des animaux tant terrestres qu'aquatiques, soit de mer, soit de rivière. *Mém. Acad. r. Sci. Paris* 1709, 364-400.
- Richardot M. and Wautier J. (1972) Les cellules à calcium du conjonctif de *Ferrissia wautieri* (Moll. Ancyliidae). *Z. Zellforsch* 134, 227-243.
- Robertson J.D. (1941) The function and metabolism of calcium in the invertebrata. *Biol. Rev.* 16, 106-133.
- Roer R. and Dillaman R. (1984) The structure and calcification of the crustacean cuticle. *Amer. Zool.* 24: 893-909.
- Rudall K.M. (1963) The chitin/protein complexes of insect cuticles. In *Advances in insect physiology*, Vol. I (ed. J.W.L. Beament, J.E. Treherne and V.B. Wigglesworth) pp. 257-311. London, New York: Academic Press.
- Saleuddin A.S.M. and Wilbur K.M. (1969) Shell regeneration in *Helix pomatia*. *Canad. J. Zool.* 47, 51-53.
- Samata T., Sanguansri P., Cazaux C., Hamm M., Engels J. and Krampitz G. (1980) Biochemical studies on components of mollusc shells. In *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants* (ed. M. Omari and N. Watabe) pp. 37-47. Tokyo, Japan: Tokai Univ. Press.
- Sanders S.S., Hayne Jr.V.B. and Rehm W.S. (1973) Normal  $H^+$  rates in frog stomach in absence of exogenous  $CO_2$  and a note on pH stat method. *Am. J. Physiol.* 225, 1311-1321.
- Schafer J.A. and DiBona D.R. (1984) Epithelial permeability. In *Edema* (ed. N.C. Staub and A.E. Taylor) pp. 95-115. New York: Raven Press.
- Schaefer C.H. and Dupras E.F. (1976) Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field waters. *J. Agric. Food. Chem.* 25, 1026-1030.
- Seed R. (1983) Structural organization, adaptive, radiation, and classification of molluscs. In *The Mollusca* Vol. I (ed. K.M. Wilbur and P.W. Hochachka) pp. 1-54. New York: Academic Press.
- Simroth H. and Hoffmann H. (1928) Mollusca, Gastropoda, Pulmonata. In *Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs* Vol. 3 (ed. H.G. Bronn) pp 178-205.
- Sioli H. (1935) Über den chemismus der Reparatur von Schalendefekten bei *Helix pomatia*. *Zool. Jb. Physiol.* 54, 507-534.



- Sparkes S. and Greenaway P. (1984) The haemolymph as a storage site for cuticular ions during premoult in the freshwater land crab *Holthuisia transversa*. *J. exp. Biol.* 113, 43-54.
- Sminia T., With N.D., Bos J.L., Nieuwmegen M.E., Witter M.P. and Wondergem J. (1977) Structure and function of the calcium cells of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands J. Zool.* 27, 195-208.
- Sorenson A.L., Wood D.S. and kirschner L.B. (1980) Electrophysiological properties of resting secretory membranes of lamellibranch mantles. *J. Gen. Physiol.* 75, 21-37.
- Steedman H.F. (1950) Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin. *Q. Jl. Microsc. Sci.* 91, 477-479.
- Steinmetz P.R., Omachi R.S. and Frazier H.S. (1967) Independence of hydrogen ion secretion and transport of electrolytes in turtle bladder. *J. Clin. Inv.* 46, 1541-1548.
- Steinmetz P.R. and Andersen O.S. (1982) Electrogenic proton transport in epithelial membranes. *J. Membr. Biol.* 65, 155-174.
- Stoner L.C., Burg M.B. and Orloff J. (1974) Ion transport in cortical collecting tubule: effect of Amiloride. *Am. J. Physiol.* 227, 453-459.
- Storer T.I., Stebbins R.C., Usinger R.L. and Nybakken J.W. (1979) *General Zoology*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Stryer L. (1988) Membrane transport. In *Biochemistry*, 3<sup>a</sup> Edition pp. 949-974. New York: W.H. Freeman and Company.
- Takatsuki S. (1934) On the nature and function of the amoebocyte of *Ostrea edulis*. *Q. Jl. Microsc. Sci.* 76, 379-431.
- Taylor J.D., Kennedy W.J. and Hall A. (1969) The shell structure and mineralogy of the bivalvia. *Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Zool.) Suppl.* 3, 1-125.
- Teorell T. (1951) The acid-base balance of the secreting isolated gastric mucosa. *J. Physiol. Lond.* 114, 267-276.
- Teorell T. (1953) Transport process and electrical phenomena in ionic membranes. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* 3, 305.
- Thain J.E. and Waldock M.J. (1986) The impact of tributyltin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Wat. Sci. Tech.* 18, 193-202.



- Thiéry J.P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6, 987-1018.
- Thomas R.C. (1978) *Ion-sensitive Intracellular Microelectrodes*. pp. 61-70. New York: Academic Press.
- Timmermans L.P.M. (1969) Studies on shell formation in molluscs. *Neth. J. Zool.* 19 (4), 417-523.
- Toennies G. and Homiller R.P. (1942) The oxidation of amino-acid by hydrogen peroxide in formic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 64, 3054-3056.
- Tsujii T. (1960) Studies on the mechanism of shell and pearl formation in Mollusca. *J. Fac. Fish. Prefect Univ. Mie.* 5, 2-7.
- Ussing H.H. (1960) The alkali metal ions in isolated systems and tissues. In *The Alkali Metal Ions in Biology*, Vol. I (ed. H.H. Ussing, P. Kruhoffer, J.H. Thaysen and N.A. Thorn) pp. 1-195. Berlin, Gottingen, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Vaidya D.P. and Nagabhushanan R. (1980) Calcium regulation in the freshwater snail *Indoplanorbis exustus* during shell repair. *Hidrobiologia* 69, 29-32.
- Van Eck W.H. (1979) Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem* 9, 295-300.
- Vaughan-Jones R.D. (1988) Regulation of intracellular pH in cardiac muscle. In *Proton Passage Across Cell Membrane*. (ed. G. Boch and J. Marsh), pp. 23-35. Chichester: John Wiley and Sons.
- Vialli M. 1953. *Introduzione alla Ricerca in Istochimica*. Lombarda, Milano: Industria Poligrafica.
- Wada K. (1961) Crystal growth of molluscan shells. *Kokuritsu Shinju Kenkyusho Hokoku (Bull. Natl. Pearl Res. Lab. [Jpn.])* 7, 703-828.
- Wada K. (1970) Studies on the calcified tissue in molluscs XVII. In *Profiles of Japanese science and scientists* (ed. H. Yukawa) pp. 226-244. Tokyo: Kodansha Ltd..
- Wada K. (1980) Initiation of mineralization in bivalve mollusc. In *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plant* (ed. M. Omori and N. Watabe), pp. 79-92. Tokyo: Tokai University Press.



- Wagge L.E. (1951) Amoebocytic activity and alkaline phosphatase during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. *Q. Jl. Micro. Sci.* 92, 307-321.
- Wagner B.M. (1964) Shell formation and regeneration. In *Physiology of Mollusca* Vol.I (ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge) New York, London: Academic Press.
- Wagner B.M. and Shapiro S.H. (1957) Application of alcian blue as a histochemical method. *Lab. Invest.* 6, 472-477.
- Waldock M.J. and Thain J.E. (1983) Shell Thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Marine pollution Bulletin* 14 (11), 411-415.
- Watabe N. (1965) Studies on shell formation. XI. Crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusc shells. *Ultrastructure Research* 12, 351-370.
- Weast R.C., Astle M.J. and Beyer W.H. (1984) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Weiner S. (1979) Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusc shells. *Calcif. Tissue Int.* 29, 163-167.
- Weiner S. (1984) Organization of organic matrix components in mineralized tissues. *Amer. Zool.* 24, 945-951.
- Weiner S. and Hood L. (1975) Soluble proteins of the organic matrix of mollusc shells: a potential template for shell formation. *Science (Washington D.C.)* 190, 987-989.
- Weiner S. and Traub W. (1981) Organic-matrix-mineral relationships in mollusc shell nacreous layers. In *Structural Aspect of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules* (M. Balaban, J.L. Sussman W. Traub and A. Yong) pp 467-482. Philadelphia: Baladan ISS, Rehovot.
- Weiner S. Traub W. and Lowenstam H.A. (1983) Organic matrix in calcified exoskeletons. In *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation* (ed. P. Westbroek and de E.W. Jong) pp. 205-224. Dordrecht Holland: D. Reidel Publ. Co..
- Weis J.S. and Ma A. (1987) Effects of the pesticide diflubenzuron on larval horseshoe crabs, *Limulus polyphemus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 224-228.



- Weis J.S., Cohen R. and Kwiatkowski J.K. (1987) Effects of diflubenzuron on limb regeneration and molting in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Aquat. Toxicol.* 10, 279-290.
- Wheeler A. P. (1975) *Oyster Mantle Carbonic Anhydrase: Evidence for Plasma Membrane-Bound Activity and for a Role in Bicarbonate Transport*. Durham, North Carolina: Ph.D. Thesis, Duke Univ..
- Wheeler A.P., Georges J.W. and Evans, C.A. (1981) Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* 212, 1397-1398.
- Wheeler A.P. and Sikes C.S. (1984) Regulation of carbonate calcification by organic matrix. *Amer. Zool.* 24, 933-944.
- Wilbur K.M. (1960) Shell structure and mineralization in molluscs. In *Calcification in Biological Systems* (ed. R.F. Sognnaes) pp. 15-40.
- Wilbur K.M. (1964) Shell formation and regeneration. In *Physiology of Mollusca* Vol. I (ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge) pp. 243-282. New York, London: Academic Press.
- Wilbur K.M. (1972) Shell formation and regeneration. In *The Physiology of Mollusca*, vol. I (ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge), pp. 243-282. New York: Academic Press.
- Wilbur K.M. (1976) Recent studies of invertebrate mineralization. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (ed. N. Watabe and K.M. Wilbur) pp. 79-108. Columbia: Univ. South Carolina Press.
- Wilbur K.M. (1983) Shell formation. In *The Physiology of Mollusca*, Vol. IV (ed. K.M. Wilbur and A.S.M. Saleuddin), pp. 235-287. New York: Academic Press.
- Wilbur K.M. (1984) Many minerals, several phyla, and a few considerations. *Amer. Zool.* 24, 839-845.
- Wilbur K.M. and Manyak D.M. (1984) Biochemical aspects of mollusca shell mineralization. In *Proceedings on Marine Biodeterioration* (ed. J.D. Costlow and R. Tipper), pp. 30-37. Bethesda: Naval Institute Press.
- Wilbur K.M. and Saleuddin A.S.M. (1983) Shell formation. In *The Mollusca* Vol. 4 (ed. K.M. Wilbur and A.S.M. Saleuddin) pp. 235-287. New York: Academic Press.

- Wilbur K.M. and Simkiss K. (1979) Carbonate turnover and deposition by metazoa. In *Biogeochemical Cycling of Mineral-forming Elements* (ed. P.A. Trudinger and D.J. Swaine) pp. 69-106. Amsterdam: Elsevier.
- Wilbur K.M. and Watabe M. (1963) Experimental studies on calcification in molluscs and the alga *Cocolithus huxley*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 104, 82-112.
- Willunsem N.J. and Larsen E.H. (1986) Membrane potencial and intracellular  $\text{Cl}^-$  activity of toad skin epithelium in relation to activation and deactivation of transepithelial  $\text{Cl}^-$  conductance. *Journal of Membrane Biology* 94, 173-190.
- Yonge C.M. (1926) Structure and physiology of organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 14, 295-386.
- Zandee D.I., Kluytmans J.H., Zurburg W. and Pieter H. (1980) Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research* 14 (1), 1-29.
- Zuckerman J.J., Reisdorf R.P., Ellis III H.V. and Wilkinson R.R. (1978) Organotins in biology and the environment. In *Organometals and Organometaloids, Occurrence and Fate in the Environment*, ACS Symp. Ser. 82 (ed. F.E. Brinckman and J.M. Bellama) pp. 388-422. American: Chemical Society.